UNIVERSITÉ PAUL-SABATIER
U.E.R. DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

ANNÉE 1971 N° 58

ÉTUDES TOXICOLOGIQUES DE SIX DERIVES DE LA SÉRIE CYCLOHEXANIQUE

LES DICHLOROCYCLOHEXANONES GEMINÉE, CIS, TRANS LES DICHLOROCYCLOHEXANOLS GEMINE, CIS-CIS, CIS-TRANS

THÈSE

Pour le doctorat en pharmacie

(Diplôme d'État)

Présentée et soutenue publiquement en novembre 1971

par

Claire GENOLINI

Pharmacien

Attachée de Recherches au C.N.R.S.

Membres du Jury

Mme	CAUJOLLE	*Président*
MM.	CAUJOLLE	*Assesseurs*
	BOUISSOU	
	PITET	
	CROS	*Suppléant*

CEPADUES
29, boul. Carnot, 29
TOULOUSE

UNIVERSITÉ PAUL-SABATIER
U.E.R. DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

ANNÉE 1971 N° 58

ÉTUDES TOXICOLOGIQUES DE SIX DERIVES DE LA SÉRIE CYCLOHEXANIQUE

LES DICHLOROCYCLOHEXANONES GEMINÉE, CIS, TRANS LES DICHLOROCYCLOHEXANOLS GEMINE, CIS-CIS, CIS-TRANS

THÈSE

Pour le doctorat en pharmacie

(Diplôme d'État)

Présentée et soutenue publiquement en novembre 1971

par

Claire GENOLINI

Pharmacien

Attachée de Recherches au C.N.R.S.

Membres du Jury	Mme CAUJOLLE	*Président*
	MM. CAUJOLLE	*Assesseurs*
	BOUISSOU	
	PITET	
	CROS	*Suppléant*

CEPADUES
29, boul. Carnot, 29
TOULOUSE

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

UNIVERSITE PAUL SABATIER

118, Route de Narbonne

31 - TOULOUSE

TABLEAU DU PERSONNEL

UNITE PHARMACEUTIQUE

Président de l'Université : Monsieur LARENG
1er Vice-Président : Monsieur MATHIS
Directeur de l'Unité : Monsieur BREUILLAUD
Doyens honoraires : Messieurs LAZORTHES, BRUSTIER
Professeurs honoraires : Messieurs DELAS, VINCENT, Madame DULUCQ

- Botanique et Cryptogamie	MM. N .....
- Chimie Analytique	PITET
- Toxicologie, Hygiène industrielle et Hydrologie	BOURBON
- Chimie pharmaceutique	BLANC
- Microbiologie	BREUILLAUD
- Pharmacie chimique et Pharmacodynamie	CAUJOLLE
- Pharmacie galénique et Matière médicale	STANISLAS
- Physiologie, Zoologie et Parasitologie pharmaceutique	ROUX

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

- Pharmacie	MM. COUTURIER
- Sciences Naturelles	Mme CAUJOLLE
- Toxicologie	BROUSSY G.
- Zoologie	GAYREL

PROFESSEURS SANS CHAIRE

- Chimie organique	MM. BERTRAND

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

- Botanique	Mme LASCOMBES
- Microbiologie	MM. MICHEL
- Pharmacodynamie	CROS
- Physiologie	DUMAS
- Pharmacie galénique	ROUFFIAC
- Chimie Biologique	SOULA
- Toxicologie	MALBOSC

Secrétaire Général de l'Université : Monsieur PRINEAU J. P.

L'Université déclare n'être pas responsable des opinions émises par les candidats.

-:-

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536520_0072

A LA MEMOIRE DE MES GRANDS PARENTS

A MON PERE ET MA MERE

A TOUTE MA FAMILLE

A TOUS MES AMIS

En témoignage de ma profonde affection.

A NOTRE MAITRE

MONSIEUR LE PROFESSEUR F. CAUJOLLE

Professeur de Pharmacie, chimique et de Pharmacodynamie

à l'U.E.R. des Sciences Pharmaceutiques,

Directeur du Centre de Recherches sur les Toxicités,

Membre de l'Académie de Pharmacie,

Correspondant de l'Académie de Médecine,

Officier de la Légion d'honneur.

A ce Maître qui nous a fait le très grand honneur de nous accueillir au Centre de Recherches sur les Toxicités, et qui par ses judicieux conseils et sa bienveillante sollicitude a su nous donner le goût de la recherche.

Qu'il trouve dans ce travail le témoignage de notre profonde gratitude et de notre respectueuse et fidèle admiration.

A MADAME LE PROFESSEUR D. CAUJOLLE - MEYNIER

Professeur de Sciences Naturelles

PRESIDENT DE NOTRE JURY DE THESE

Nous avons eu le privilège de bénéficier de votre enseignement qui fut détermiant pour notre orientation.

Nous sommes profondément heureuse de vous exprimer ici nos sentiments de respectueuse gratitude pour la confiance que vous nous avez accordée, pour les conseils et les encouragements quotidiens qui nous ont permis de réaliser ce modeste travail.

Qu'il nous soit permis de vous exprimer notre profonde admiration et notre respectueux attachement.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR H. BOUISSOU

Professeur d'Anatomie pathologique

Avec notre respectueuse reconnaissance pour avoir dirigé la partie anatomo-pathologique de ce travail et pour l'honneur qu'il nous a fait de siéger à notre Jury de Thèse.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR G. PITET

Professeur de Chimie analytique

Nous lui exprimons nos vifs remerciements pour avoir bien voulu juger notre travail et participer à notre Jury de Thèse.

A MONSIEUR J. CROS

Maître de Conférences agrégé de Pharmacodynamie

Avec nos sincères remerciements et le témoignage de notre amicale sympathie.

A TOUS NOS MAITRES DE L'ECOLE DE MEDECINE
ET DE PHARMACIE DE ROUEN

A TOUS NOS MAITRES DE LA FACULTE MIXTE
DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DE TOULOUSE

A MONSIEUR G. FAURE
Docteur Vétérinaire, Ingénieur au C.N.R.S.

AU SERVICE D'ANATOMIE PATHOLOGIQUE
AU SERVICE DE SYNTHESE ORGANIQUE
du Centre de Recherches sur les Toxicités

Pour leur aide précieuse et leur amicale collaboration, le témoignage de notre vive reconnaissance.

A NOS COLLEGUES DU SERVICE DE
MADAME LE PROFESSEUR D. CAUJOLLE - MEYNIER

Dont l'esprit d'équipe, la gentillesse et la cordialité nous ont sans cesse encouragée.

A TOUS NOS COLLEGUES ET AMIS DU CENTRE
DE RECHERCHES SUR LES TOXICITES

AVANT-PROPOS

L'étude des chlorocyclanones, tant au point de vue toxicologique que pharmacodynamique, a été entreprise au Laboratoire de Pharmacie Chimique de la Faculté mixte de Médecine et de Pharmacie de Toulouse, puis poursuivie au Centre de Recherches sur les Toxicités, sous la direction des Professeurs F. CAUJOLLE et D. CAUJOLLE. (CAUJOLLE F., CAUJOLLE D. et al., 1962, 1964, 1965, 1966, 1969. MOLINIER J., 1963, CAHUZAC A.M., 1970).

Il a semblé intéressant à M. Le Professeur F. CAUJOLLE de développer ces recherches en envisageant l'étude Toxicologique des dérivés dichlorés de la série cyclohexanique :

Dichlorocyclohexanones	Géminée
	Cis
	Trans,
Dichlorocyclohexanols	Géminé
	Cis-Cis
	Cis-Trans.

Ces dérivés nous permettaient d'aborder le problème de l'activité des couples de stéréoisomères, sur le plan toxicologique et surtout métabolique.

Ainsi, nous avons déterminé la toxicité, les propriétés pharmacodynamiques essentielles et les principales formes d'excrétions des substances envisagées, dont certaines ont été préparées pour la première fois, en vue de notre travail, par le Laboratoire de synthèse organique du Centre de Recherches sur les Toxicités sous la direction de M. DANG QUOC QUAN.

PLAN

PREMIERE PARTIE

DONNEES PHYSICOCHIMIQUES

I - PREPARATION ET CONTROLE DE PURETE

- α) *Dichlorocyclohexanones*
- β) *Dichlorocyclohexanols*

II - STRUCTURES - PROPRIETES PHYSIQUES ET CHIMIQUES

A) Etude structurale et conformationnelle

- α) *Dichlorocyclohexanones*
- β) *Dichlorocyclohexanols*

B) Propriétés Physiques

C) Propriétés Chimiques

- α) *Dichlorocyclohexanones*

1 - Isomérisation
2 - Déchlorhydratation
3 - Dérivés caractéristiques

- β) *Dichlorocyclohexanols*

DEUXIEME PARTIE

ETUDE DE L'INTOXICATION AIGUE PAR LES DICHLOROCYCLOHEXANONES GEMINEE, CIS ET TRANS ET PAR LES DICHLOROCYCLOHEXANOLS GEMINE, CIS-CIS ET CIS-TRANS

I - PROTOCOLE EXPERIMENTAL

A) Les animaux d'expérience

B) Administration du produit

C) Examens anatomopathologiques

D) Expression des résultats

II - RESULTATS EXPERIMENTAUX

A) Caractéristiques numériques de l'intoxication

B) Symptomatologie de l'intoxication

- Souris

α) *Dichlorocyclohexanones*
β) *Dichlorocyclohexanols*

- Rat

C) Examens anatomopathologiques

D) Discussion des résultats

1 - Toxicité et isomérie
2 - Toxicité différée
3 - Influence de la voie d'administration sur la toxicité
4 - Toxicité comparée à l'égard des deux espèces animales
5 - Influence de la réduction sur la toxicité immédiate et différée des dichlorocyclohexanones
6 - Influence de la chloruration sur la toxicité immédiate et différée.

TROISIEME PARTIE

ETUDE PHARMACODYNAMIQUE

CHAPITRE I

EFFETS HYPOTHERMISANTS

A) Protocole expérimental

B) Résultats expérimentaux

C) Conclusions

CHAPITRE II

EFFETS HYPNOTIQUES ET RENFORCATEURS A L'EGARD DE L'HEXOBARBITAL

I - EFFETS HYPNOTIQUES

A) Protocole expérimental

B) Résultats expérimentaux

II - POTENTIALISATION DE L'HEXOBARBITAL

A) Protocole expérimental

B) Résultats expérimentaux

III - CONCLUSIONS

CHAPITRE III

EFFETS ANTICONVULSIVANTS

I - EFFETS PROTECTEURS VIS A VIS DU PENTETRAZOL

A) Protocole expérimental

B) Résultats expérimentaux

II - EFFETS PROTECTEURS VIS A VIS DE LA STRYCHNINE

A) Protocole expérimental

B) Résultats expérimentaux

III - CONCLUSIONS

CHAPITRE IV

EFFETS ANALGESIQUES CENTRAUX

A) Protocole expérimental

B) Résultats expérimentaux

CONCLUSIONS

QUATRIEME PARTIE

ETUDE DU METABOLISME DES DICHLOROCYCLOHEXANONES ET DES DICHLOROCYCLOHEXANOLS ISOMERES

Considérations préliminaires

CHAPITRE I

ETUDE DE L'ELIMINATION URINAIRE

I - DONNEES BIOLOGIQUES

A) Choix des Animaux

B) Conditions expérimentales

II - DONNEES BIOCHIMIQUES

A) Dosage des formes glucuro et sulfoconjuguées

1 - Dosage des glucuroconjugués
2 - Dosage des sulfoconjugués

B) Identification des métabolites urinaires, libres ou libérés par hydrolyse des formes conjuguées

1 - Techniques générales d'extraction
2 - Techniques d'hydrolyse
- hydrolyse acide
- hydrolyse enzymatique
3 - Technique de séparation par adsorption sur gel de silice
4 - Technique d'entraînement à la vapeur d'eau
5 - Technique de chromatographie sur couches minces
α - Le support
β - Les substances de références
γ - Les systèmes de solvants
δ - Les réactifs de détection
6 - Technique de chromatographie en phase vapeur

C) Recherche des acides mercapturiques

III - RESULTATS EXPERIMENTAUX

A) Formes conjuguées urinaires

- α) Glucuroconjugués totaux
- β) Sulfoconjugués totaux

B) Identification des métabolites urinaires libres ou glucuroconjugués

- α) Par chromatographie sur couches minces
- β) Par chromatographie en phase vapeur

C) Recherche des acides mercapturiques

D) Conclusions

CHAPITRE II

ETUDE DE L'ELIMINATION BILIAIRE ET FECALE

I - DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

II - ELIMINATION BILIAIRE ET REABSORPTION INTESTINALE

A) Collecte de la bile

B) Dosage des formes glucuroconjuguées

1 - Techniques expérimentales
2 - Résultats expérimentaux

C) Recherches des formes glucuroconjuguées

1 - Techniques expérimentales
2 - Résultats expérimentaux

III - ELIMINATION FECALE

A) Protocole expérimental

B) Résultats expérimentaux

IV - CONCLUSIONS

CHAPITRE III

CONCLUSIONS ET DISCUSSIONS

PREMIERE PARTIE

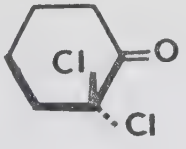
DONNEES PHYSICO-CHIMIQUES

Nous avons réuni ici les caractéristiques physico-chimiques des dichlorocyclohexanones et des dichlorocyclohexanols isomères.

La connaissance de ces propriétés nous paraît être nécéssaire avant d'aborder l'étude toxicologique et le devenir métabolique de ces substances.

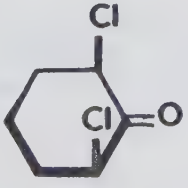
La dichloration de la cyclohexanone en position α permet d'atteindre 3 stéréoisomères dont la structure se définit respectivement ainsi :

Isomère αα : Géminé

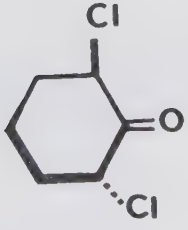


Isomères αα' :

Cis

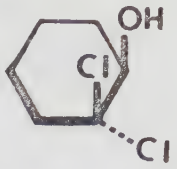


Trans

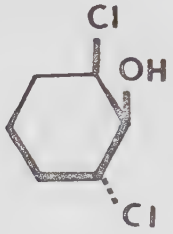


La dichloration du cyclohexanol en position α permet d'atteindre 4 stéréoisomères. Leur structure peut être ainsi définie :

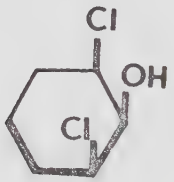
Isomère αα : Géminé



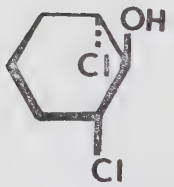
Isomères αα' : Cis-Trans



Cis-Cis



Trans-Trans



Notre étude toxicologique a porté sur les trois dichlorocyclohexanones stéréoisomères et sur les trois dichlorocyclohexanols suivants :

- Géminé
- Cis-Trans
- Cis-Cis.

L'isomère trans-trans a été atteint en quantités très faibles ; nous n'avons pas pu entreprendre une étude complète de son activité sur l'animal. L'échantillon mis à notre disposition nous a seulement permis d'effectuer une étude chromatographique, et de nous assurer que cet isomère ne figurait pas parmi les métabolites des substances envisagées.

I - PREPARATION ET CONTROLE DE PURETE

- α) *Dichlorocyclohexanones*

Les méthodes de préparation concernant les trois stéréoisomères ont été décrites par DANG QUOC QUAN, 1961. Nous nous contenterons de rappeler brièvement ici les principales méthodes.

Isomère GEMINE

L'isomère géminé est obtenu par l'addition en quantités stoechiométriques du chlorure de sulfuryle à une solution de chloro-2-cyclohexanone, réalisée dans le mélange chlorure de méthylène-dioxanne anhydre. On opère à 0°C.

Isomère CIS

La dichlorocyclohexanone géminée, mise en solution dans l'acide acétique glacial contenant du gaz chlorhydrique, est chauffée pendant 3 heures au bain-marie bouillant. Cette opération conduit à un mélange des deux isomères cis et trans, pratiquement exempt de géminé, que l'on sépare par distillation sous vide poussé.

L'isomère cis est purifié par une recristallisation.

Isomère TRANS

Pour atteindre cet isomère avec un plus grand degré de pureté, on réalise la même opération sur la dichlorocyclohexanone cis mais à plus basse température (1 h à 80°C).

La mesure du point d'ébullition, de l'indice de réfraction, de la densité ainsi que la détermination du temps de rétention en chromatographie gazeuse sur briques de silicone, permettent de vérifier l'identité et le degré de pureté de chaque produit.

Le tableau n° 1 présente les constantes physiques intéressant les trois cétones.

- β) *Dichlorocyclohexanols*

La méthode de préparation des dichlorocyclohexanols repose sur la réduction des cétones chlorées correspondantes par l'hydrure de lithium aluminium vers 0°C : SCHLENK H. et LAMP B., 1951, CAUJOLLE F. et DANG QUOC QUAN, 1969.

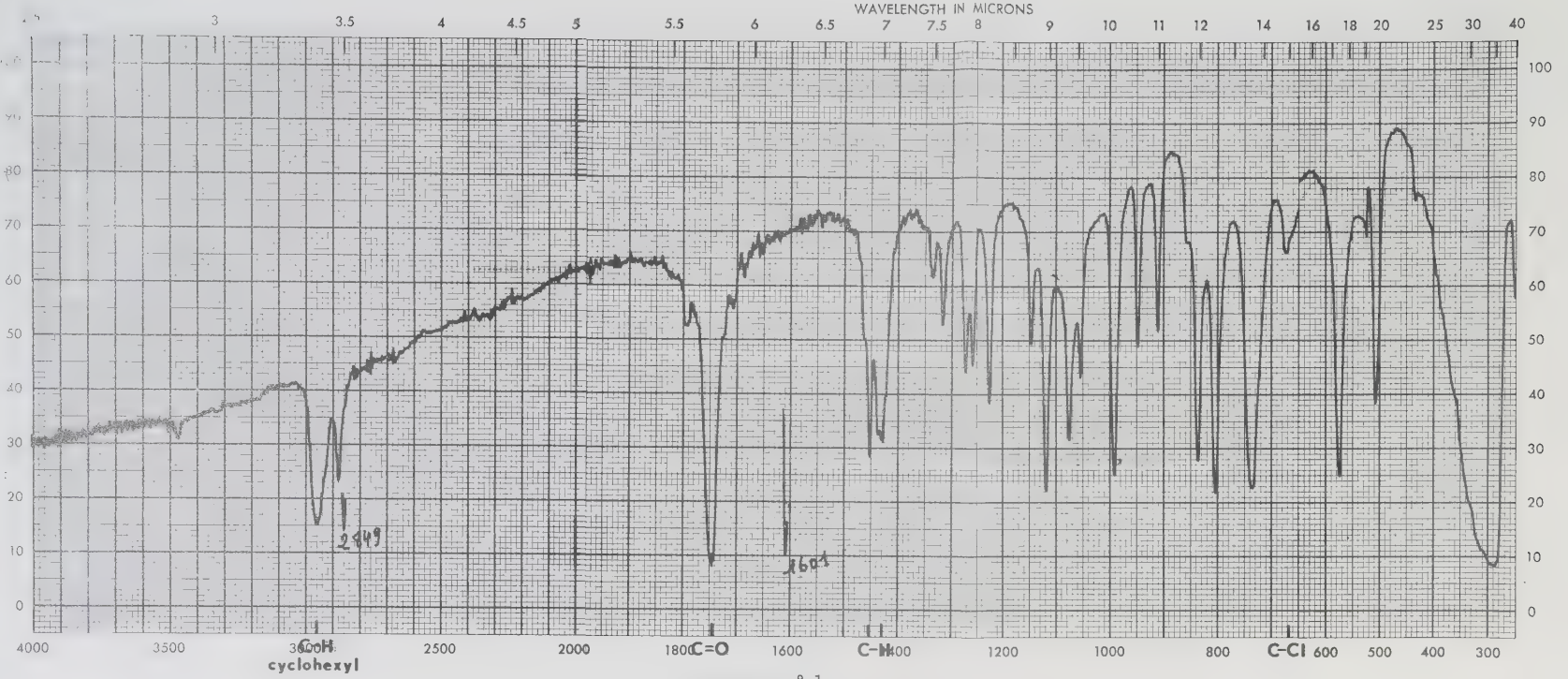
La réaction est conduite en milieu éther anhydre, sous atmosphère d'azote ; l'hydrolyse s'effectue par une solution aqueuse d'acide sulfurique au 1/10.

La réduction complète de la fonction cétone est vérifiée par spectrométrie infra-rouge (disparition complète du pic ν Co vers 1700-1750 cm^{-1}). (Graphiques n° 1 à 7).

Les isomères αα géminé et αα' cis-trans sont isolés à l'état pur après distillation.

La réduction de la dichlorocyclohexanone cis donne lieu à la formation de deux isomères, dans les proportions suivantes : 75 % de cis-cis et 25 % de trans-trans. La chromatographie sur colonne de silice permet de séparer convenablement les 2 isomères.

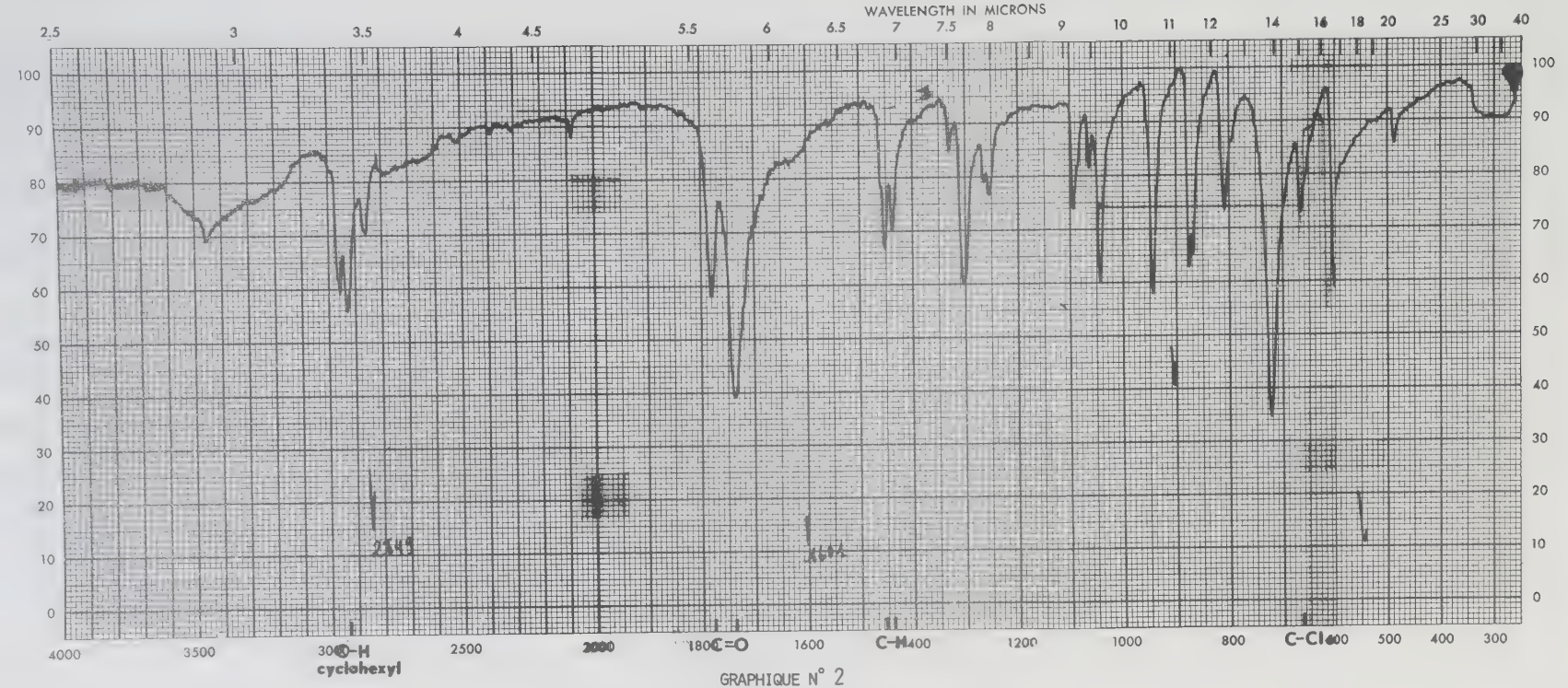
La chromatographie en phase gazeuse sur Carbowax 20 M a permis de contrôler le degré de pureté des composés.



GRAPHIQUE N° 1

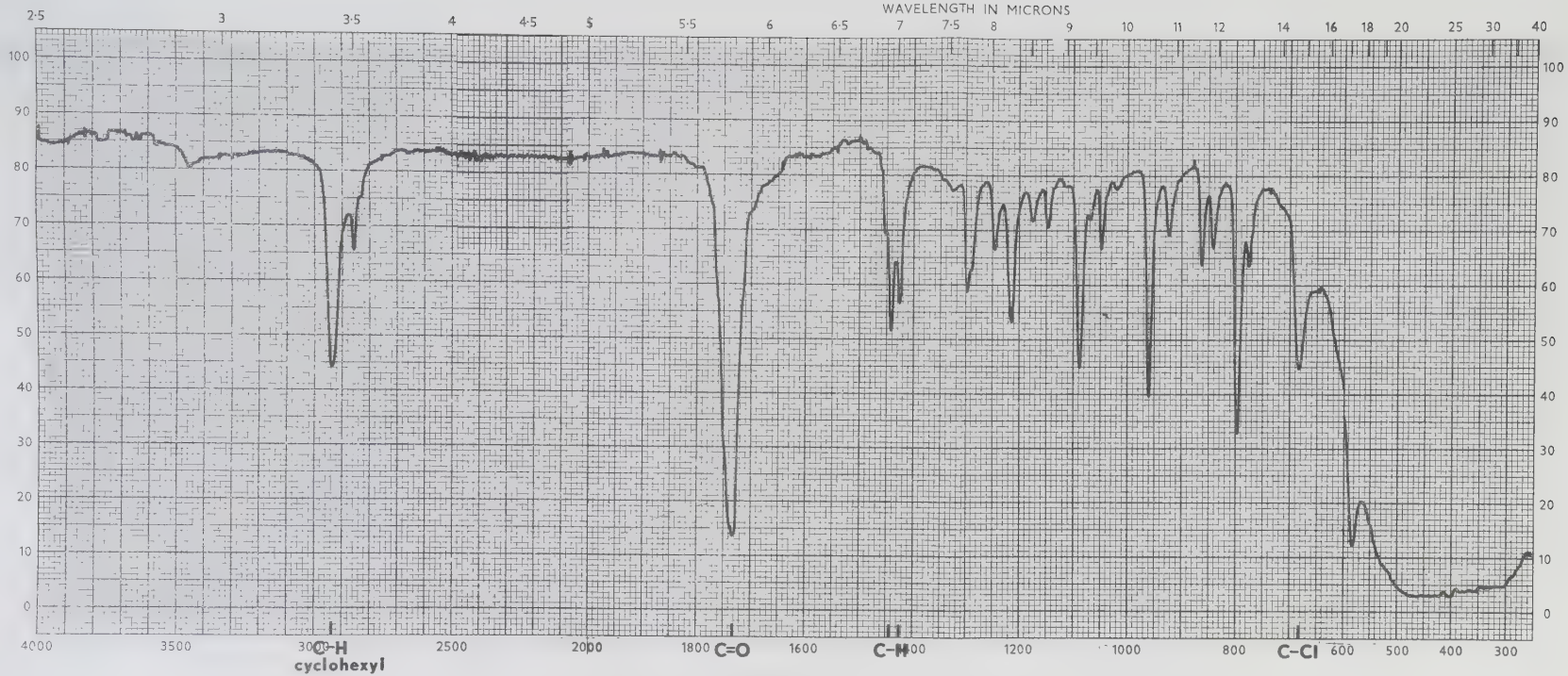
SPECTRE I.R. DE LA DICHLOROCYCLOHEXANONE GEMINEE
DANS LE BROMURE DE POTASSIUM

PRINTED IN U.S.A.



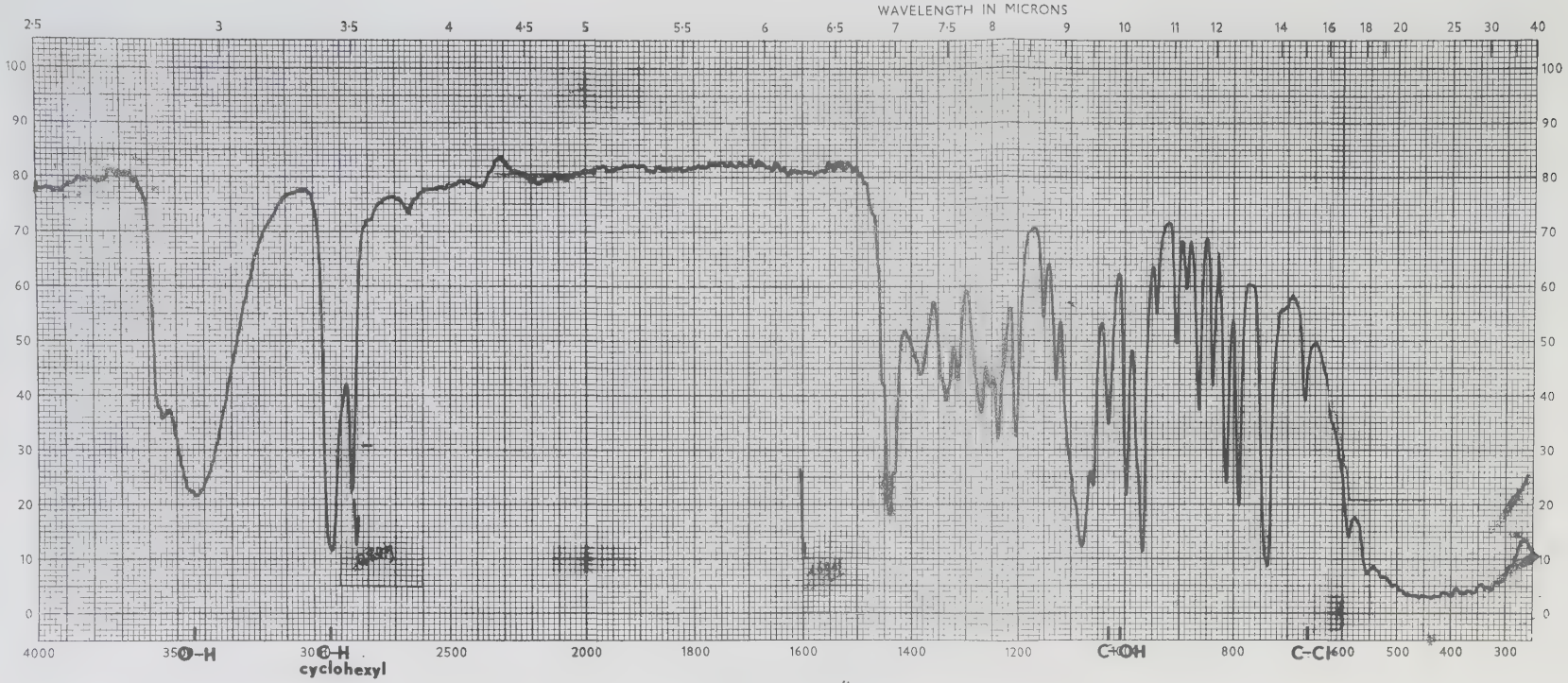
GRAPHIQUE N° 2

SPECTRE I.R. DE LA DICHLOROCYCLOHEXANONE CIS
DANS LE BROMURE DE POTASSIUM



GRAPHIQUE N° 3

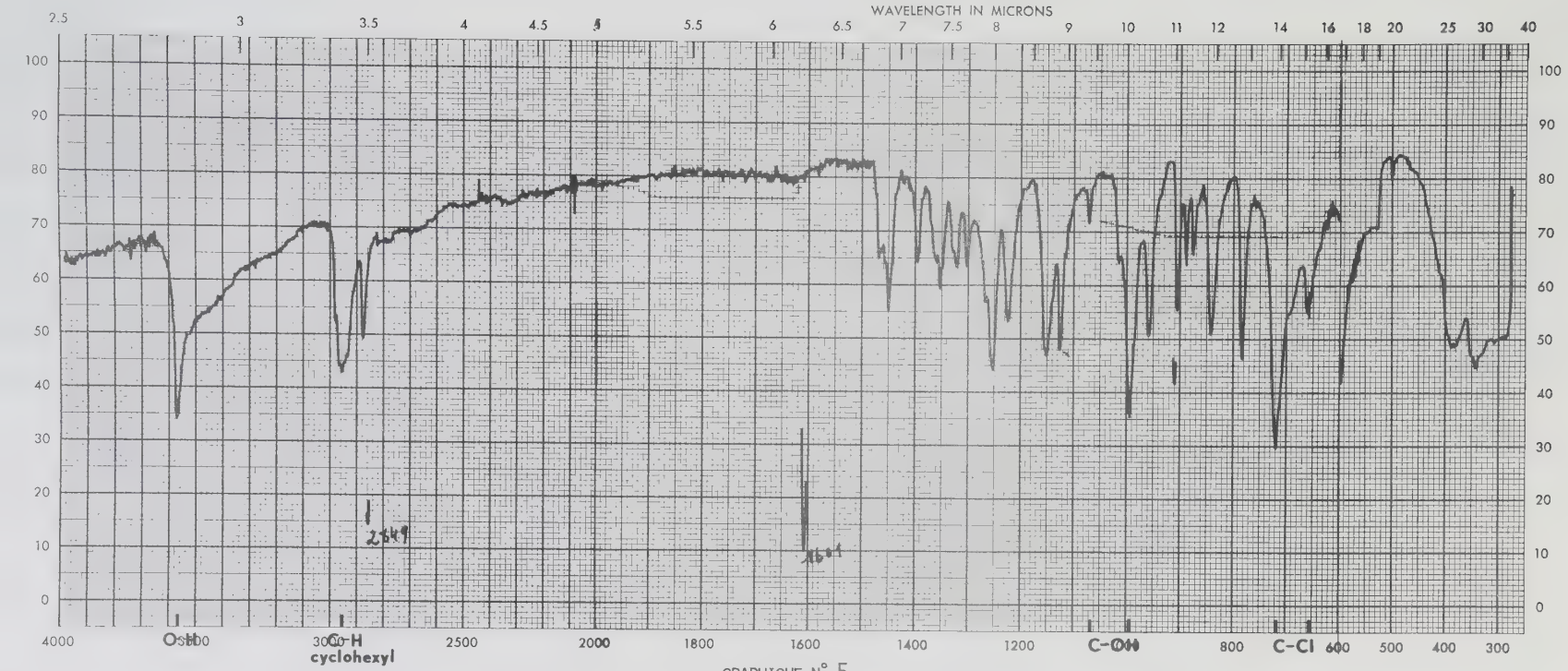
SPECTRE I.R. DE LA DICHLOROCYCLOHEXANONE TRANS
DANS LE BROMURE DE POTASSIUM



GRAPHIQUE N° 4

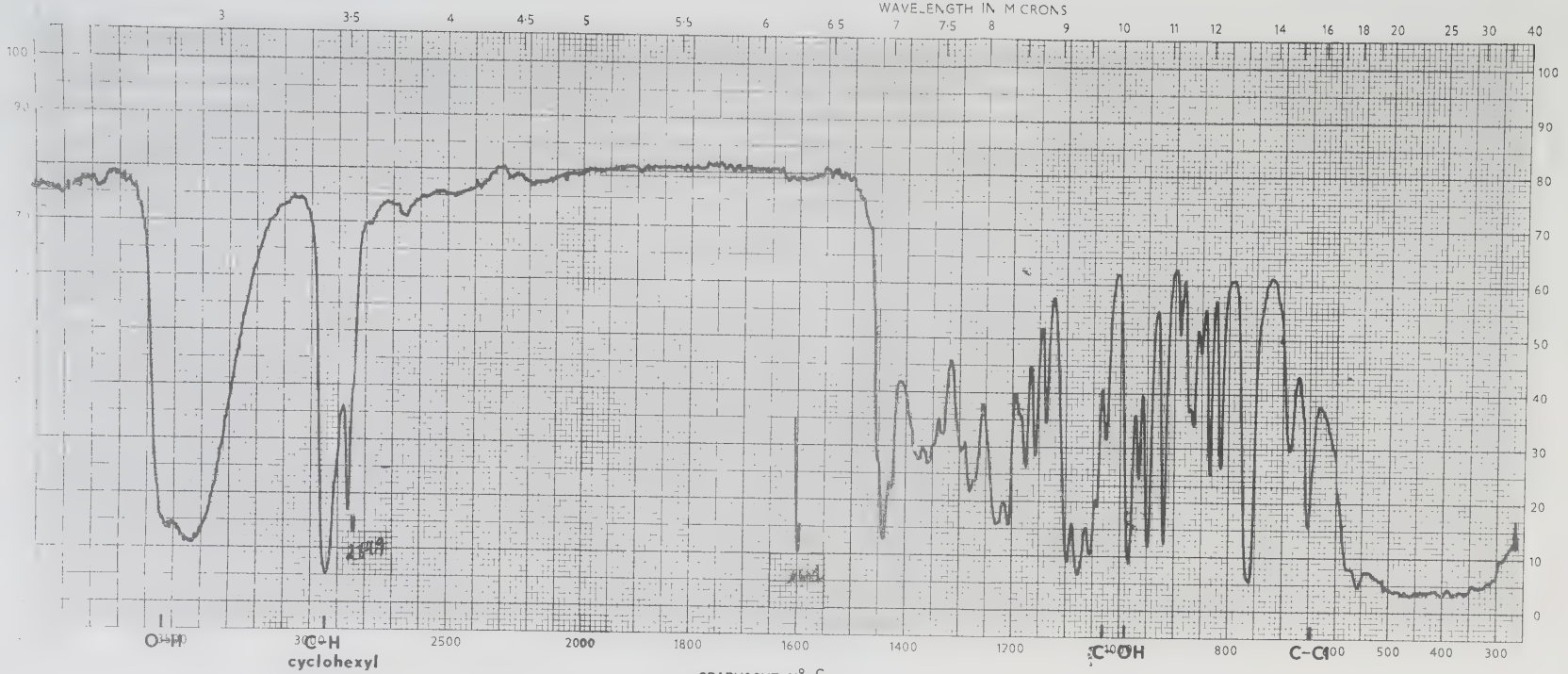
SPECTRE I.R. DU DICHLOROCYCHLOHEXANOL GEMINE
DANS LE BROMURE DE POTASSIUM

PRINTED IN U.S.A.



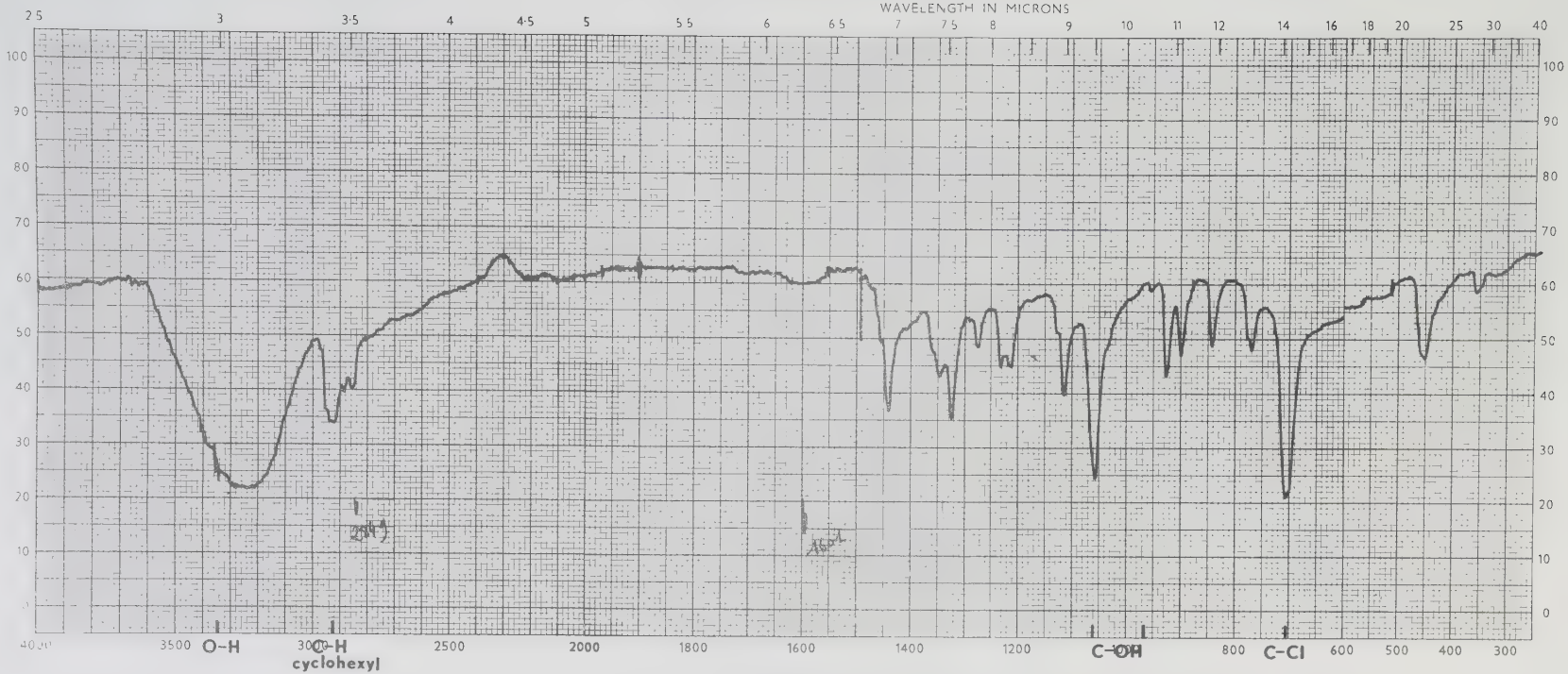
GRAPHIQUE N° 5

SPECTRE I.R. DU DICHLOROCYCLOHEXANOL CIS-CIS
DANS LE BROMURE DE POTASSIUM



GRAPHIQUE N° 6

SPECTRE I.R. DU DICHLOROCYCLOHEXANOL CIS-TRANS
DANS LE BROMURE DE POTASSIUM



GRAPHIQUE N° 7

SPECTRE I.R. DU DICHLOROCYCLOHEXANOL TRANS-TRANS
DANS LE BROMURE DE POTASSIUM

II - STRUCTURES - PROPRIETES PHYSIQUES ET CHIMIQUES

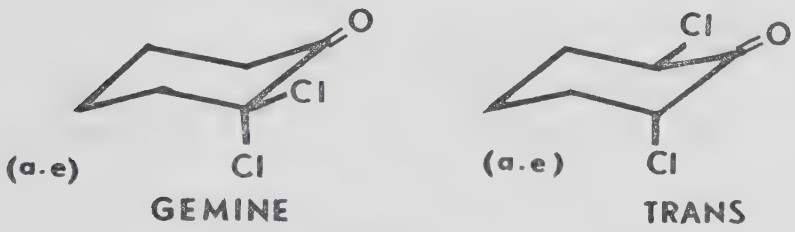
A) Etude structurale et conformationnelle

- α) *Dichlorocyclohexanones*

L'analyse structurale et conformationnelle des dichlorocyclohexanones a été réalisée par DANG QUOC QUAN, 1961, en s'appuyant sur les résultats acquis par COREY E. J., 1953, avec les homologues dibromés.

La conformation chaise qui confère au cycle une plus grande stabilité, doit être prévue pour les trois isomères.

Les isomères géminé et trans possèdent chacun un chlore axial et un équatorial.



Pour l'isomère cis l'équilibre des deux conformations chaises, l'une à chlores axiaux l'autre à chlores équatoriaux, se réalise même à l'état cristallisé.

CIS

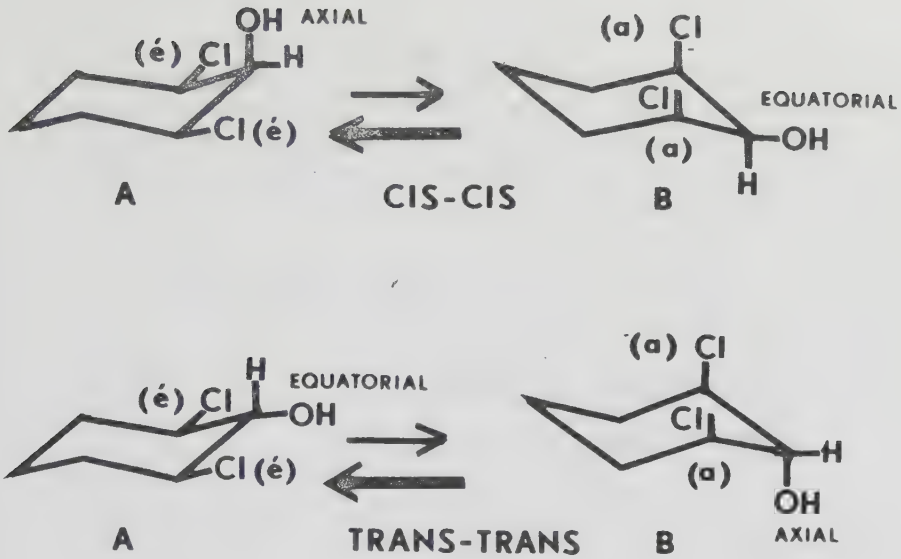
- β) *Dichlorocyclohexanols*

La configuration spatiale des alcools stéréoisomères a été déterminée en suivant le protocole proposé par BARLETT P. D., 1935, pour l'étude structurale des chloro-2-cyclohexanols : l'action de la soude en milieu hydroalcoolique à froid ne s'exerce pas sur l'isomère cis-cis, alors que l'isomère trans-trans subit une déchlorhydratation.

La spectrométrie infra-rouge (graphiques n° 4 à 7) a permis de déterminer la conformation des quatre dichlorocyclohexanols : CAUJOLLE F. et DANG QUOC QUAN, 1969.

GEMINE

CIS-TRANS



Pour les isomères géminé et cis-trans, l'équilibre des deux conformations chaises se réalise entre deux formes axiale-équatoriale.

Par contre pour les isomères cis-cis et trans-trans, l'équilibre entre les deux conformations chaises se trouve déplacé et conduit à la prédominance de la forme A : 2 chlores diéquatoriaux, OH axial dans le cas de l'isomère cis-cis et à la forme A : 2 chlores diéquatoriaux, OH équatorial dans le cas de l'isomère trans-trans.

B) Propriétés physiques

Les tableaux n° 1 et 2 réunissent les constantes physiques des cétones et des alcools dichlorés.

La détermination du coefficient de solubilité dans l'eau a été ainsi effectuée : on agite pendant 1 heure 1g. de produit avec 21 à 23 ml d'eau distillée ; on filtre la solution à travers un filtre plissé humide ; on prélève 20 ml de filtrat que l'on épuise par 4 fois 10 ml d'éther. Les phases éthérées, séchées sur sulfate de sodium anhydre, sont évaporées à sec sous pression réduite et le résidu est pesé après dessication sous vide sur anhydride phosphorique.

Tous les produits sont entraînables à la vapeur d'eau.

C) Propriétés chimiques

- α) *Dichlorocyclohexanones*

Les propriétés chimiques des dichlorocyclohexanones isomères ont été étudiées par DANG QUOC QUAN, 1961.

1.- L'isomérisation est obtenue par chauffage dans un solvant anhydre contenant du gaz chlorhydrique dissous comme catalyseur. En opérant en milieu acide acétique glacial, les 3 produits réagissent de la manière suivante :

Dichlorocyclohexanone GEMINE $\xrightarrow[3h \text{ à } 90^\circ]{AcOH\text{-}HCl}$ TRANS + CIS irréversible

Dichlorocyclohexanone TRANS $\underset{1h \text{ à } 80^\circ}{\overset{AcOH\text{-}HCl}{\rightleftharpoons}}$ Dichlorocétone CIS

L'isomérisation trans→cis peut se produire en l'absence de solvant quand la substance est conservée à l'état liquide, pendant plus de 4 mois.

Nous avons assuré sa conservation à l'état solide, en plaçant la dichlorocyclohexanone trans à la température de -20°C pendant toute la durée de notre expérimentation.

TABLEAU N° 1

DICHLOROCYCLOHEXANONES PM = 167

PROPRIETES PHYSIQUES

Produit	Fusion °C	Ebullition °C	Indice de réfraction	Densité	Solubilité dans l'eau à 24°C (g/100 ml)	Temps de rétention chromato. gaz. (minutes)*
GEMINEE	20	$Eb_{0,2}$ = 40-41	n_D^{20}=1,4947	$D_4^{16,5}$=1,2977	1,3	10,2
CIS	72	$Eb_{0,2}$ = 82-83	-	-	0,67	16,2
TRANS	8	$Eb_{0,2}$ = 60-61	n_D^{20}= 1,5040	D_4^{19}= 1,3151	3,6	12

*Aerograph A. 700 Colonne 20 % SE 30 20'3/8" t° col. 190°C

gaz vecteur : helium

TABLEAU N° 2

DICHLOROCYCLOHEXANOLS PM 169

PROPRIETES PHYSIQUES

Produit	Fusion °C	Ebullition °C	Indice de réfraction	Densité	Solubilité dans l'eau à 24°C (g/100 ml)	Temps de rétention chromato. gaz. (minutes)*
GEMINE	26 (éther de pétrole)	Eb_4 = 67	n_D^{20}=1,5083	D_{20}^{20}=1,295	1,35	15,1
CIS-CIS	48-49 (hexane)	$Eb_{0,5}$=72	n_D^{50}=1,5022	-	2,35	45,5
CIS-TRANS	-	Eb_6 = 91	n_D^{20}=1,5160	D_{20}^{20}=1,315	1,81	26,8

* Aerograph A. 700 Colonne 10 % Carbowax 20 M 10' 1/4" t° col. 172°C

Les dichlorocyclohexanones géminée et cis ont été conservées à -4°C, température qui assurait leur stabilité.

La chromatographie en phase vapeur permet de contrôler l'intégrité des échantillons stockés.

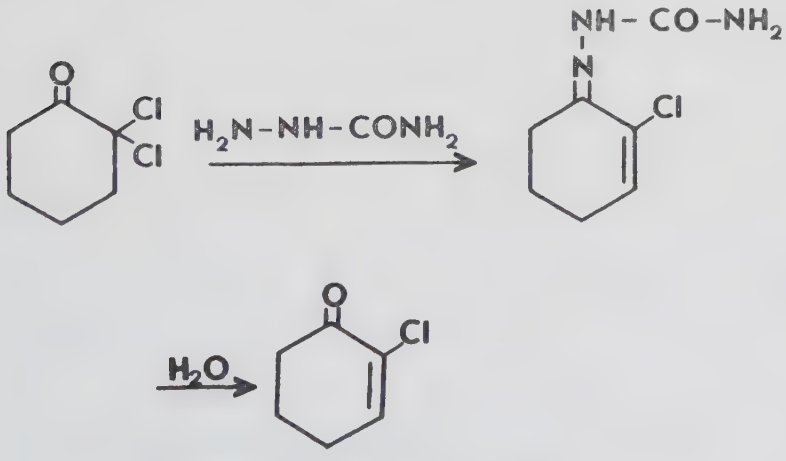
2.- Déchlorhydratation

* Déchlorhydratation directe : le chauffage dans le diméthylformamide contenant du chlorure de lithium en solution (HOLYSZ R.P., 1949) entraîne l'apparition de phénol dans le cas des trois dichlorocétones isomères.

La quantité de phénol obtenue est dans l'ordre décroissant :

GEMINEE	<	TRANS	<	CIS
45% phénol		20% phénol		8% phénol

* La déchlorhydratation indirecte de la dichlorocyclohexanone géminée a été obtenue par action de la semi-carbazide, selon la réaction suivante :



CHLORO-2-CYCLOHEXENE-2-3-ONE-1

Avec les dichlorocyclohexanones symétriques ce réactif conduit à des semi-carbazones dichlorées.

3.- Dérivés caractéristiques des dichlorocyclohexanones

Les trois dichlorocyclohexanones isomères conduisent à la formation de dérivés caractéristiques avec la dinitro-2-4-phénylhydrazine, la semi-carbazide et l'hydroxylamine.

- β) *Dichlorocyclohexanols*

Nous n'avons pu recueillir aucune donnée concernant les propriétés chimiques des dichloroalcools.

L'étude de ces propriétés est engagée dans notre Laboratoire.

DEUXIEME PARTIE

ETUDE DE L'INTOXICATION AIGUE PAR LES DICHLOROCYCLOHEXANONES GEMINEE, CIS ET TRANS ET LES DICHLOROCYCLOHEXANOLS GEMINE, CIS-CIS ET CIS-TRANS

Toxicité immédiate et différée à l'égard de la Souris et du Rat.

I - PROTOCOLE EXPERIMENTAL

A) Les animaux d'expérience

Les animaux que nous avons utilisés pour notre étude, provenaient de l'élevage du Centre de Recherches sur les Toxicités et présentaient les caractéristiques suivantes :

- Les Souris blanches (Mus Musculus, variété albinos, souche Swiss) étaient âgées de 4 à 5 semaines et pesaient de 20 à 26 g.

- Les Rats blancs (Rattus norvegicus, variété albinos, souche Wistar, lignée A-G), étaient âgés de 7 à 9 semaines et pesaient de 180 à 220 g.

Les animaux ont été groupés par 5 sujets de même sexe dans des cages en Makrolon dont la litière, faite de copeaux de bois de résineux, était renouvelée deux fois par semaine.

Les locaux d'expérimentation étaient maintenus à une température ambiante comprise entre 21° et 23°C. Le degré hygrométrique variait entre 50 et 60 % et une faible luminosité était assurée.

La nourriture de ces animaux fournie par la Société des Aliments J. O. F. à Toulouse était exclu-

sivement constituée par un aliment complet biscuité bien équilibré dont la composition était la suivante :

Céréales	65 %
Issues	3 %
Tourteaux expellers	10,5 %
Farine d'origine animale	9,5 %
Activateurs de croissance	8 %
Composé minéral vitaminisé (A. D. groupe B.Méthionine)	4 %

Les animaux disposaient d'eau à volonté.

B) Administration du produit

Deux voies d'administration ont été retenues : la voie intrapéritonéale (I. P.) et la voie entérale (P. O.).

Les substances proposées à notre étude présentant un faible coefficient de solubilité dans l'eau, nous avons retenu un véhicule à caractère lipophile : des solutions dans l'huile d'olive, neutralisée selon la technique décrite dans la Pharmacopée française dans l'édition de 1965 (=H. O. N), ont été réalisées par agitation à froid ; les solutions de dichlorocyclohexanone cis et de dichlorocyclohexanol cis-cis ont été réalisées par agitation à chaud (40° à 50°C).

En toute rigueur, l'étude comparative de l'intoxication par différentes substances réalisée sur une même espèce animale, par une voie d'administration déterminée, requiert, durant toute la durée des essais, le maintien constant de la concentration de la solution administrée. Dans le cas particulier de notre étude, l'agressivité des substances mises à l'épreuve s'est exercée à des degrés trop différents et la solubilité dans l'H.O.N. s'est révélée dans certains cas trop limitée, pour nous permettre de respecter la généralité de cette règle.

Des essais complémentaires réalisés afin de déterminer dans quelle mesure les variations de la concentration influençaient les résultats obtenus, ont montré que la toxicité des substances envisagées était indépendante de la concentration utilisée.

Le volume administré par l'une ou l'autre voie était compris entre 0,08 et 0,50 ml pour la Souris et 0,1 et 1,5 ml pour le Rat.

L'administration per orale a été réalisée à l'aide d'une sonde rigide métallique de 10/10 mm de diamètre pour la Souris, et d'une sonde flexible en polyvinyle de 12/10 mm de diamètre pour le Rat.

Des essais préliminaires, conduits sur des lots à effectif limité (3 mâles et 3 femelles), ont permis une approche des caractéristiques numériques de l'intoxication.

Les essais définitifs ont été conduits sur des lots de 5 mâles et 5 femelles.

Après l'épreuve, les animaux ont été soigneusement observés jusqu'à la récupération de leur comportement normal ; ils ont été pesés une fois par semaine et maintenus en observation pendant 28 jours. Chaque échéance mortelle a été notée.

C) Examens Anatomopathologiques

Des animaux n'ayant pas survécu à l'intoxication ainsi que des sujets sacrifiés au terme des essais ont été autopsiés et leurs organes ont subi un examen macroscopique et microscopique.

Des essais systématiques ont été pratiqués afin d'étudier la réversibilité des lésions déterminées à la suite de l'intoxication. Des lots de 5 à 10 animaux ont été sacrifiés à échéance variable.

Les poumons, le coeur, la rate, les surrénales, les gonades, le foie, les reins et la vessie ont été prélevés et fixés dans le liquide de DUBOSQ-BRAZIL (Pratique du Laboratoire MASSON, 1958). Après inclusion

dans la paraffine, les pièces sont traitées suivant les techniques histologiques courantes. Une coloration au P. A. S. (Periodic Acid Schiff) est pratiquée sur le foie pour une étude de sa charge glycogénique. Des prélèvements hépatiques, après fixation dans le formol à 10 %, sont coupés au microtome à congélation en vue d'une recherche des graisses par la coloration au Soudan IV.

D) Expression des résultats

De premiers essais nous ont permis d'établir la valeur de la dose maximale jamais mortelle en 24 heures (D. M. J. M. 24 h), ainsi que la valeur de la dose minimale toujours mortelle en 24 heures (D. m. T. M. 24 h).

Nous avons ensuite administré les doses comprises entre ces deux doses limites, choisies équidistantes suivant l'échelle logarithmique à base 10. Les résultats obtenus ont conduit à la détermination de la dose léthale 50 en 24 heures (D. L. 50 24h).

Ces trois valeurs permettent d'apprécier la toxicité proximale de la substance étudiée. Afin d'estimer la toxicité distale de la substance selon CAUJOLLE F. et MEYNIER D., 1957, les caractéristiques suivantes ont été ensuite établies :

- Temps de crise : Temps après lequel aucune mortalité n'est plus enregistrée
- Dose infraléthale (D. I. L.) : Dose maximale jamais mortelle au temps de crise
- Dose minimale toujours mortelle au temps de crise (D. T. M.).

L'administration de doses comprises d'une part, entre la D. I. L. et la D. M. J. M. 24 h et d'autre part, entre la D. I. L. et la D. T. M. (en

respectant entre ces doses le même intervalle déjà adopté lors de la détermination de la D. L. 50 24 h) a permis de déterminer la dose léthale 50 limite (D.L. 50 limite) ou indice d'agressivité.

La méthode des "Probits" (BLISS C. I., 1938, FINNEY D. J., 1952, MOULAS F., 1964) a été utilisée pour la détermination de la D.L. 50 24h, de la D.L. 50 limite et de leurs limites de confiance, pour une probabilité de 95 %. Cette méthode comporte un calcul itératif basé sur une droite de régression provisoire obtenue par la méthode de Kärber ou à partir d'un graphique.

Administrés par la voie orale, les dichlorocyclohexanols cis-cis et cis-trans ont manifesté à l'égard du Rat une agressivité peu marquée. La faible importance des échantillons de chaque substance dont nous disposions a limité le nombre des essais conduits sur cette espèce. Seule la D. I. L. a pu être déterminée.

II - RESULTATS EXPERIMENTAUX

A) Caractéristiques numériques de l'intoxication

Les caractéristiques numériques de l'intoxication par les dichlorocyclohexanones et les dichlorocyclohexanols sont rassemblées dans les tableaux n°3 à 6.

Les résultats obtenus chez le Rat et chez la Souris n'ont fait apparaître aucune différence significative entre les mâles et les femelles dans les caractéristiques de l'agressivité toxique. Nous avons donc réuni dans un même tableau les valeurs établies après l'intoxication des sujets des deux sexes.

Au cours des essais réalisés avec les dichlorocyclohexanols cis-cis et cis-trans, les données numériques concernant les D. L. 50 / P. O. ont été rendues techniquement inaccessibles dans les conditions expérimentales adoptées.

B) Symptomatologie de l'intoxication

D'une façon générale la voie d'administration ne détermine pas de différence sensible dans la symptomatologie de l'intoxication.

SOURIS

- α) *Dichlorocyclohexanones*

L'administration des doses infraléthales de chacune des trois substances est immédiatement suivie d'une courte phase d'agitation réactionnelle. Les animaux courent en tout sens dans les limites de la cage et présentent de façon générale un état d'hypersensibilité.

Des spasmes lombaires sont observés surtout après l'administration des isomères trans et géminé. Après quelques minutes, les animaux se calment et ont tendance à se grouper, immobiles. Ils conservent cependant une excitabilité nettement plus accusée qu'à l'état normal.

Les signes extérieurs de l'intoxication qui sont observés par la suite, permettent de distinguer nettement l'isomère géminé des isomères cis et trans.

En effet, les dichlorocyclohexanones cis et trans déterminent uniquement un léger fléchissement du tonus musculaire, accompagné d'une hypothermie de l'ordre de 2 à 4°C. La température centrale redevient normale au bout de 3 heures.

Par contre, après épreuve à la dichlorocyclohexanone géminée, on observe au bout de 5 à 10 minutes la disparition des réflexes : réflexe de redressement, réflexe oculo-palpébral, réflexe à la douleur provoquée ; cet état peut se prolonger durant 1 à 3 heures. Chez certains sujets, des manifestations convulsives (opisthotonos) marquent le début de cette phase. La narcose entre ensuite dans une phase profonde, au cours de laquelle la sensibilité géné-

TABLEAU N° 3

DICHLOROCYCLOHEXANONES — Voie I. P. 10 %

TOXICITE COMPAREE A L'EGARD DE LA SOURIS — Voie orale 20 %

Dose g/kg	GEMINEE		CIS		TRANS	
Dose mM/kg	I. P.	P. O.	I. P.	P. O.	I. P.	P. O.
DMJM/24 h.	0,73 *4,41*	0,59 *3,53*	0,189 *1,13*	0,200 *1,19*	0,100 *0,59*	0,11 *0,65*
DL 50 /24 h.	0,95 (0,85-1,21) *5,68*	1,59 (1,34-1,92) *9,4*	0,31 (0,28-0,34) *1,85*	0,505 (0,39-0,64) *3,02*	0,19 (0,16-0,23) *1,13*	0,41 (0,3-0,59) *2,45*
DmTM /24h.	1,11 *6,64*	2,83 *16,9*	0,500 *3*	1,52 *9,1*	0,40 *2,4*	1,01 *6,04*
Temps de crise	3 j.	5 j.	4 j.	3 j.	7 j.	8 j.
DIL	0,70 *4,2*	0,35 *2,1*	0,062 *0,35*	0,200 *1,19*	0,025 *0,15*	0,11 *0,65*
DTM	1,11 *6,64*	2,83 *16,9*	0,33 *1,97*	1,01 *6,04*	0,200 *1,2*	1,01 *6,04*
DL 50 Temps de crise	0,91 (0,87-0,95) *5,44*	1,41 (1,16-1,80) *8,44*	0,137 (0,103-0,166) *0,82*	0,43 (0,34-0,55) *2,58*	0,067 (0,052-0,082) *0,40*	0,29 (0,21-0,40) *1,73*

TABLEAU N° 4

DICHLOROCYCLOHEXANONES

TOXICITE COMPAREE A L'EGARD DU RAT

Dose g/kg *Dose mM/kg*	GEMINEE		CIS		TRANS	
	I. P. 20 %	P. O. 50 %	I. P. 10 %	P. O. 20 %	I. P. 10 %	P. O. 20 %
DMJM/24 h.	0,45 *2,7*	1,24 *7,42*	0,19 *1,13*	0,22 *1,31*	0,099 *0,59*	0,29 *1,73*
DL 50/24 h.	0,65 (0,46-0,76) *3,9*	2,7 (2,4-2,9) *16,1*	0,27 (0,23-0,39) *1,61*	0,79 (0,6-1,03) *4,73*	0,16 (0,14-0,19) *0,95*	0,88 (0,68-1,14) *5,26*
DmTM/24 h.	1,10 *6,58*	3,81 *22,8*	0,50 *2,99*	2 *11,9*	0,31 *1,85*	2 *11,9*
Temps de crise	9 j.	24 h.	7 j.	2 j.	6 j.	4 j.
DIL	0,41 *2,45*	1,24 *7,42*	0,013 *0,077*	0,22 *1,3*	0,022 *0,13*	0,29 *1,73*
DTM	1,10 *6,58*	3,81 *22,8*	0,19 *1,13*	1,68 *10*	0,099 *0,59*	1,59 *9,52*
DL 50 Temps de crise	0,59 (0,52-0,67) *3,53*	2,70 (2,4-2,91) *16,1*	0,05 (0,04-0,06) *0,3*	0,72 (0,55-0,96) *4,31*	0,048 (0,04-0,05) *0,28*	0,74 (0,59-0,94) *4,43*

TABLEAU N° 5

DICHLOROCYCLOHEXANOLS — Voie I. P. 5 %

TOXICITE COMPAREE A L'EGARD DE LA SOURIS — Voie orale 20 %

Dose g/kg *Dose mM/kg*	GEMINE		CIS-CIS		CIS-TRANS	
	I. P.	P. O.	I. P.	P. O.	I. P.	P. O.
DMJM/24 h.	0,79 *4,67*	0,74 *4,37*	0,41 *2,42*	0,59 *3,55*	0,81 *4,8*	0,76 *4,5*
DL 50/24 h.	0,91 (0,88-0,94) *5,38*	1,22 (1,1-1,3) *7,21*	0,61 (0,55-0,66) *3,6*	1,48 (1,09-1,73) *8,7*	0,97 (0,90-1,03) *5,73*	1,43 (1,3-1,64) *8,46*
DmTM/24 h.	1,13 *6,68*	2,33 *13,7*	0,87 *5,1*	2,30 *13,6*	1,35 *7,98*	2,52 *14,9*
Temps de crise	24 h.	24 h.	3 j.	24 h.	4 j.	24 h.
DIL	0,79 *4,67*	0,74 *4,37*	0,41 *2,42*	0,59 *3,55*	0,81 *4,8*	0,76 *4,5*
DTM	1,13 *6,68*	2,33 *13,7*	0,87 *5,1*	2,30 *13,6*	1,35 *7,98*	2,52 *14,9*
DL 50 Temps de crise	0,91 (0,88-0,94) *5,38*	1,22 (1,1-1,3) *7,21*	0,56 (0,52-0,60) *3,31*	1,48 (1,09-1,73) *8,7*	0,96 (0,89-1,02) *5,68*	1,43 (1,30-1,64) *8,46*

TABLEAU N° 6

DICHLOROCYCLOHEXANOLS

TOXICITE COMPAREE A L'ECARD DU RAT

I. P. 20 %

P. O. 50 %

Dose g/kg	GEMINE		CIS-CIS		CIS-TRANS	
Dose mM/kg	I. P.	P. O.	I. P.	P. O.	I. P.	P. O.
DMJM/24 h.	0,29 *1,71*	0,74 *4,37*	0,37 *2,19*	0,94 *5,56*	0,35 *2,07*	1,26 *7,45*
DL 50/24 h.	0,53 (0,44-0,61) *3,13*	1,3 (1,13-1,49) *7,69*	0,60 (0,52-0,66) *3,55*	N. D.	0,48 (0,43-0,53) *2,84*	N. D.
DmTM/24 h.	0,95 *5,62*	2,33 *13,7*	0,95 *5,62*	N. D. > 2,11	0,71 *4,20*	N. D. > 2,24
Temps de crise	6 h.	24 h.	6 h.	24 h.	24 h.	24 h.

* N.D. : non déterminée

rale est largement diminuée. La respiration est dyspnéique ; une chute thermique de l'ordre de 4 à 5°C est enregistrée ; après 7 heures la température centrale a retrouvé sa valeur normale.

Après la récupération du réflexe de redressement, les animaux recouvrent progressivement leur habitus normal.

Les doses léthales de dichlorocyclohexanones cis et trans conduisent à une diminution plus sévère de la motricité et de la sensibilité sans toutefois qu'aucun réflexe soit aboli.

La dyspnée accompagne ces symptômes et une hypothermie s'établit de l'ordre de 5 à 6°C.

La récupération des données thermiques initiales demande 24 heures.

Les sujets appelés à succomber sont généralement atteints aux approches de l'exitus d'une paralysie flasque intéressant les membres postérieurs. On a pu noter, chez certains animaux éprouvés à la dichlorocyclohexanone cis, l'apparition d'une brève phase d'agitation convulsive survenant quelques minutes après l'injection et qui demeure dans tous les cas unique.

La dichlorocyclohexanone géminée, administrée à la dose léthale, détermine une symptomatologie qui se distingue de celle observée avec les deux autres isomères par l'apparition d'une narcose profonde pouvant se prolonger jusqu'à 7 heures après l'injection.

Le début du sommeil est marqué par des manifestations convulsives comparables à celles qui ont été observées aux plus faibles doses. A ce même stade on a pu noter chez plusieurs sujets un catatonus de la queue.

Pendant presque toute la durée du sommeil les sujets sont dans un état quasi anesthésique ; la respiration demeure spasmodique, entrecoupée de hoquets. Une hypothermie profonde s'installe de l'ordre de 6 à 8°C. La récupération de la température centrale est lente ; elle n'est totale qu'au bout de 24 h.

Au réveil, les animaux demeurent prostrés pendant 24 heures et le tonus musculaire normal se rétablit très progressivement.

- β) *Dichlorocyclohexanols*

Seules les manifestations immédiates de l'intoxication permettent de distinguer l'isomère cis-cis des deux autres isomères : cette substance détermine en effet, 2 à 3 minutes après l'injection, l'apparition d'une phase convulsive clonique, brève mais violente, suivie d'une phase tonique qui se caractérise par une extension forcée des pattes postérieures, accompagnée d'une émission d'urine. Cette crise est généralement unique et ne conduit que dans de rares cas à la mort ; elle est observée chez tous les sujets éprouvés, même après l'administration de doses voisines du 1/10ème de la dose infraléthale.

L'administration des isomères géminé et cis-trans est immédiatement suivie d'une très courte phase d'excitation.

Ces premiers symptômes ayant été constatés, le processus de l'intoxication semble évoluer de façon comparable après les trois épreuves.

On observe une réduction de l'activité motrice suivie d'une chute plus ou moins sévère du tonus musculaire général : les animaux titubent, tombent en décubitus ventral ou latéral et le réflexe de redressement s'abolit. Cet état narcotique s'installe 5 à 10 minutes après l'administration des isomères géminé et cis-trans, 30 minutes après l'administration de l'isomère cis-cis.

A la dose infraléthale, la durée de la narcose est de 1 à 2 heures pour les isomères géminé et cis-cis, de 4 à 6 heures pour l'isomère cis-trans.

Durant le sommeil, les réflexes s'abolissent et une hypothermie sévère est enregistrée ;

ainsi après l'administration de la D. I. L., la chute thermique est de l'ordre de 4 à 5°C avec l'isomère géminé, de 5 à 6°C avec l'isomère cis-trans et de 7 à 8°C avec l'isomère cis-cis ; la valeur primitive de la température centrale se rétablit respectivement au bout de 4, 6 et 8 heures.

Aux doses léthales, la mort survient après une agonie silencieuse, sans signe prémonitoire.

RAT

L'administration au Rat de dichlorocyclohexanones et des dichlorocyclohexanols conduit aux mêmes signes d'intoxication que ceux précédemment décrits chez la Souris.

Une réserve doit cependant être apportée, qui concerne l'intoxication par la dichlorocyclohexanone géminée : les manifestations convulsives, observées de façon précoce après l'injection de cette substance à la Souris, ne signent jamais l'agression chez le Rat.

C) Examens anatomopathologiques

1 - Examens réalisés lors des essais d'intoxication

Les premiers examens ont été réalisés sur des animaux morts après 24 et 48 h.

L'administration I. P. ne provoque pas d'escarres au point d'injection. A l'autopsie, les différents organes présentent un aspect normal.

Ces examens préliminaires ont révélé la présence de lésions hépatiques prédominantes chez des sujets éprouvés aux dichlorocétones cis et trans et au dichloroalcool cis-cis.

Après intoxication par la cétone géminée et les alcools géminé et cis-trans, on observe seulement une stase vasculaire pluriviscérale.

L'administration per orale des dichlorocétones cis et trans détermine l'apparition d'une gastrite hémorragique (signe de l'action très irritante de ces produits).

Chez la Souris comme chez le Rat éprouvés aux dichlorocyclohexanones cis et trans et au dichlorocyclohexanol cis-cis, par la voie I. P. aussi bien que P. O., on observe une hépatite toxique à prédominance périportale. En effet, dans ces zones lobulaires, les travées de Remarcke sont détruites par une nécrose acidophile, les capillaires sinusoïdes congestifs sont infiltrés de polynucléaires, les cellules de Kupffer s'hyperplasient. Dans le reste du parenchyme, les hépatocytes qui ont fréquemment un cytoplasme homogénéisé et des noyaux atteints de chromatolyse sont autant de signes précurseurs d'une nécrose ultérieure.

Ces phénomènes sont observés précocement : 24 heures après l'administration des produits. Un début de régénérescence cellulaire à partir des zones centrobulaires est déjà observé après 48 heures.

Des animaux ont été sacrifiés 15 à 30 jours après l'intoxication ; les organes examinés n'ont révélé aucune lésion séquellaire.

2 - Examens systématiques

Des examens systématiques, à échéance variable mais après administration d'une dose unique, ont été pratiqués chez le Rat et chez la Souris, éprouvés par voie per orale.

1) L'administration à des sujets mâles et femelles d'une dose unique égale à la D. I. L. de chacune des substances, et sacrifiés après 6, 24 et 48 heures n'a entraîné l'apparition d'aucune lésion organique.

2) L'administration à des sujets mâles et femelles d'une dose unique égale à la D. L. 50 au temps de crise a permis de mettre en évidence,

dans le cas des cétones cis et trans et de l'alcool cis-cis, des lésions hépatiques caractéristiques.

Les animaux éprouvés ont été sacrifiés après 24, 48 heures et 7 jours.

*Dans le cas des épreuves aux dichlorocyclohexanones cis et trans, le foie des sujets sacrifiés à l'échéance de 24 et 48 heures, présente une inhabituelle activité mitotique des hépatocytes, plus nette chez les sujets mâles. Les divers stades de la mitose sont représentés avec prédominance de télophase.

A l'échéance de 24 heures, l'atteinte hépatocytaire périportale est plus accentuée après l'épreuve à la cétone trans.

Au 7ème jour, le foie est redevenu normal.

*Dans le cas de l'épreuve au dichlorocyclohexanol cis-cis de nombreux phénomènes sont observés :

à l'échéance de 24 heures on observe une vacuolisation cytoplasmique des hépatocytes sans pycnose nucléaire. La charge glycogénique est nulle dans l'ensemble du parenchyme. La coloration au Soudan IV révèle une stéatose microvacuolaire des hépatocytes particulièrement prononcée dans les régions périportales. Les modifications cellulaires se compliquent parfois de nécrose de coagulation des hépatocytes périportaux.

à l'échéance de 48 heures les altérations hépatiques sont plus prononcées chez les sujets mâles. On observe de sévères lésions périportales à type de nécrose de coagulation des hépatocytes avec caryoclasie. Dans l'ensemble du parenchyme les hépatocytes sont très modifiés : noyaux turgescents avec hypertrophie nucléaire. On observe surtout une activité mitotique inhabituelle ; les différents stades de la mitose sont représentés avec toutefois une prédominance de télophases, laissant supposer une stimulation mitotique précoce.

La charge glycogénique est toujours nulle, par contre la stéatose est beaucoup moins évidente, se limitant le plus souvent aux foyers nécrotiques.

7 jours après le début de l'intoxication, lorsqu'il n'y a pas eu de lésions cellulaires graves, l'aspect du parenchyme hépatique est peu différent de la normale.

En cas d'hépatite nécrosante sévère, les séquelles sont importantes. Dans l'ensemble du parenchyme les hépatocytes prennent un aspect monstrueux : turgescence et homogénéisation cytoplasmique, polyploïdie très accentuée, formation de petits noyaux caryomériques, inclusions nucléaires persistantes de mitoses anormales. La charge glycogénique n'est pas encore reconstituée.

Durant toute la période d'observation les autres organes restent normaux.

*La dichlorocyclohexanone géminée, et les alcools géminé et cis-trans, administrés dans les mêmes conditions, se sont révélés peu agressifs pour le foie. A l'échéance de 24 heures on note une légère atteinte hépatique qui se limite à une microstéatose centrolobulaire et à une hétérogénéité de la charge glycogénique des hépatocytes.

Les sujets sacrifiés après 48 heures et 7 jours ne présentent aucun signe pathologique.

Les signes que nous venons de décrire ont été observés avec moins d'intensité chez le Rat que chez la Souris.

3) L'administration quotidienne à des sujets mâles et femelles, d'une dose égale à la moitié de la dose infraléthale, pendant 4 semaines, n'a entraîné l'apparition d'aucune lésion organique.

D) Discussion des résultats

L'étude comparée des caractéristiques numériques de l'intoxication, de la symptomatologie et des examens anatomopathologiques, peut nous permettre de formuler les conclusions suivantes :

1 - Toxicité et Isomérie

α) *CETONES* : De l'examen des tableaux n° 3 et 4 et des graphiques n° 8 et 9, il ressort que d'une façon générale, le gradient de toxicité des trois isomères s'établit ainsi (par ordre croissant)

Géminé < Cis ≠ Trans.

Si l'agressivité de l'isomère géminé se montre toujours nettement inférieure à celle des deux autres isomères (quelle que soit l'espèce animale éprouvée, la voie d'administration empruntée, l'échéance d'observation envisagée), il est sur certains points difficile de discerner une différence nette dans l'activité des isomères cis et trans : ainsi chez le Rat après administration per orale, l'isomère cis se montre au bout de 24 heures plus toxique que l'isomère trans ; au temps de crise, les caractéristiques numériques de l'intoxication par les deux isomères ne diffèrent sensiblement pas.

Le seuil de l'agressivité suit la même évolution en fonction de l'isomérie et l'isomère géminé manifeste toujours ses effets à des doses nettement supérieures à celles qui déterminent une réponse chez les deux autres isomères.

β) *ALCOOLS* : Il demeure mal aisé de reconnaître les relations existant entre l'isomérie et l'activité toxique des trois alcools envisagés. (Tableaux n° 5 et 6 - Graphiques n° 10 et 11).

La voie d'administration détermine des résultats peu comparables : (CAUJOLLE F. et al., 1970).

*Par la voie I. P. : l'ordre de toxicité croissante s'établit différemment selon l'espèce animale envisagée :

RAT : Cis-Cis ↗ Géminé ≠ Cis-Trans

SOURIS : Cis-Trans ≠ Géminé ↗ Cis-Cis

Il est intéressant de noter que les isomères géminé et cis-trans présentent une activité similaire à l'égard de chaque espèce animale, quelle que soit l'échéance d'observation.

*Par la voie P. O. : par ordre de toxicité croissante :

Cis-Cis ≠ Cis-Trans ↗ Géminé.

L'isomère géminé aussi bien chez le Rat que chez la Souris, au bout de 24 heures comme au temps de crise, se montre plus agressif que les deux autres isomères dont l'activité demeure comparable.

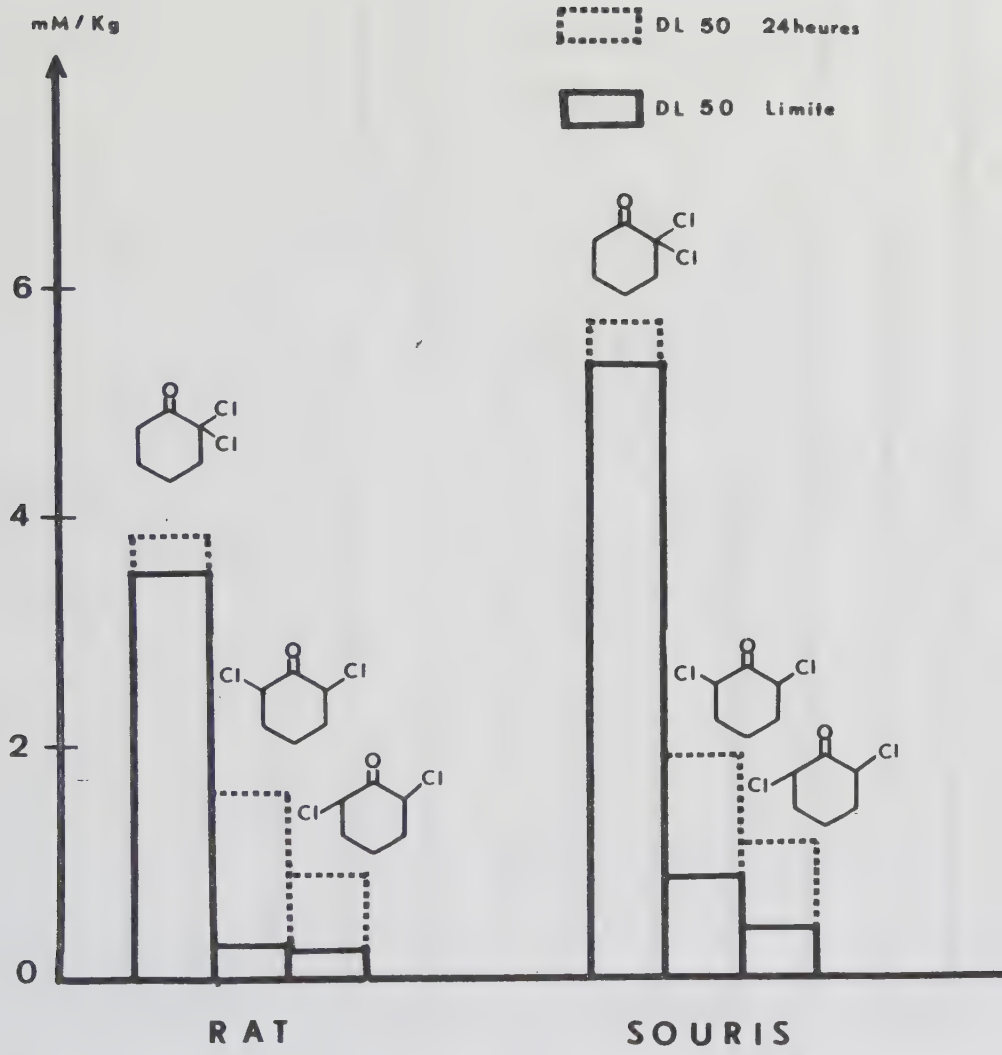
Le seuil de l'activité toxique des trois alcools essayés suit une évolution similaire en fonction de l'isomérie.

Si nous considérons les 3 cétones étudiées, il apparaît nettement que, si l'isomérie cyclanique ne crée pas de distinction nette entre les deux isomères αα', l'isomérie chimique proprement dite différentie par contre notablement l'isomère géminé qui se montre moins toxique que les dérivés αα'.

L'étude de la toxicité des trois alcools étudiés a conduit à des conclusions comparables après administration par la voie orale :

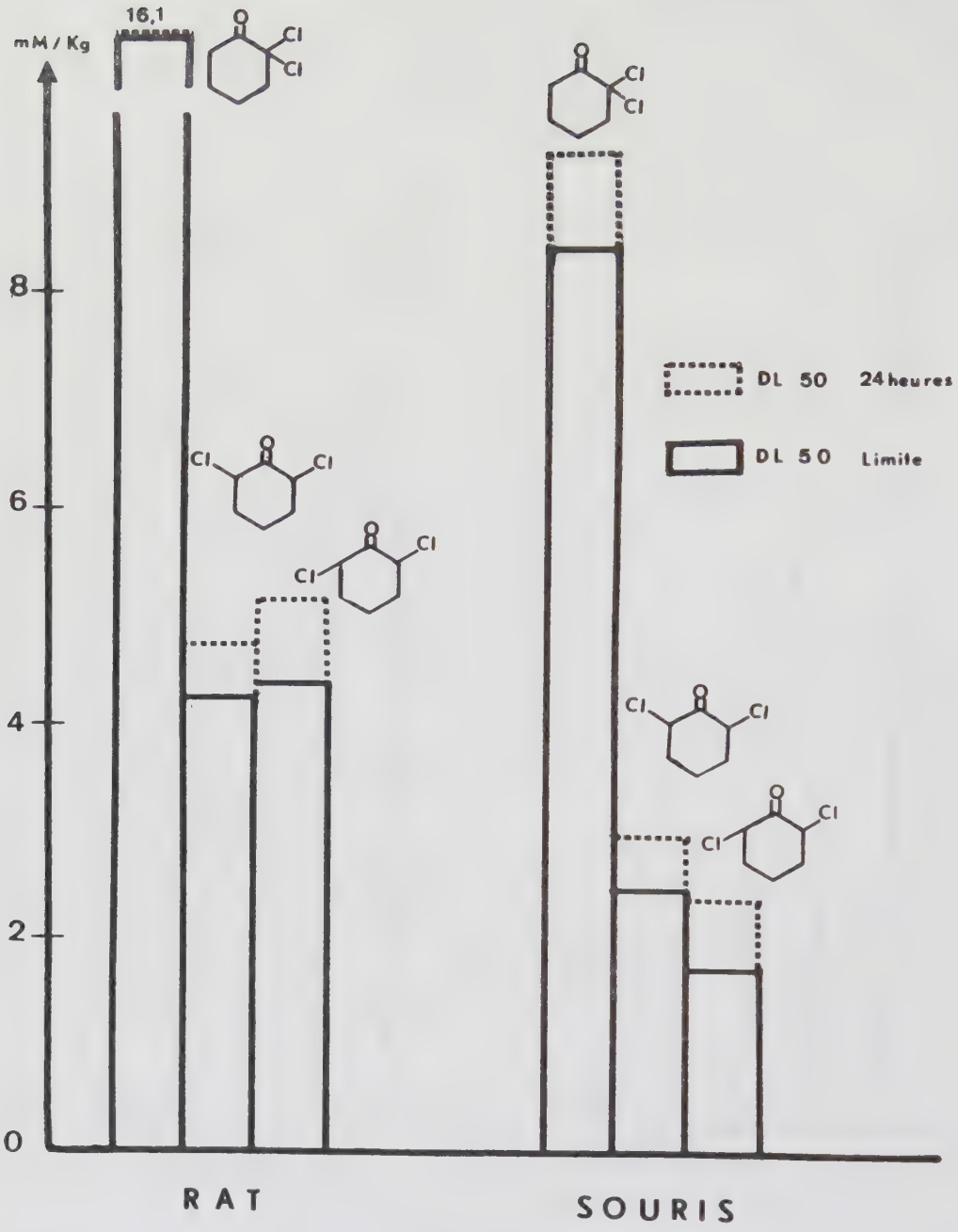
L'isomère géminé se montre nettement plus toxique que les deux isomères αα' de toxicité assez voisine.

Les résultats obtenus par la voie I. P. n'ont pas permis de formuler des conclusion analogues.



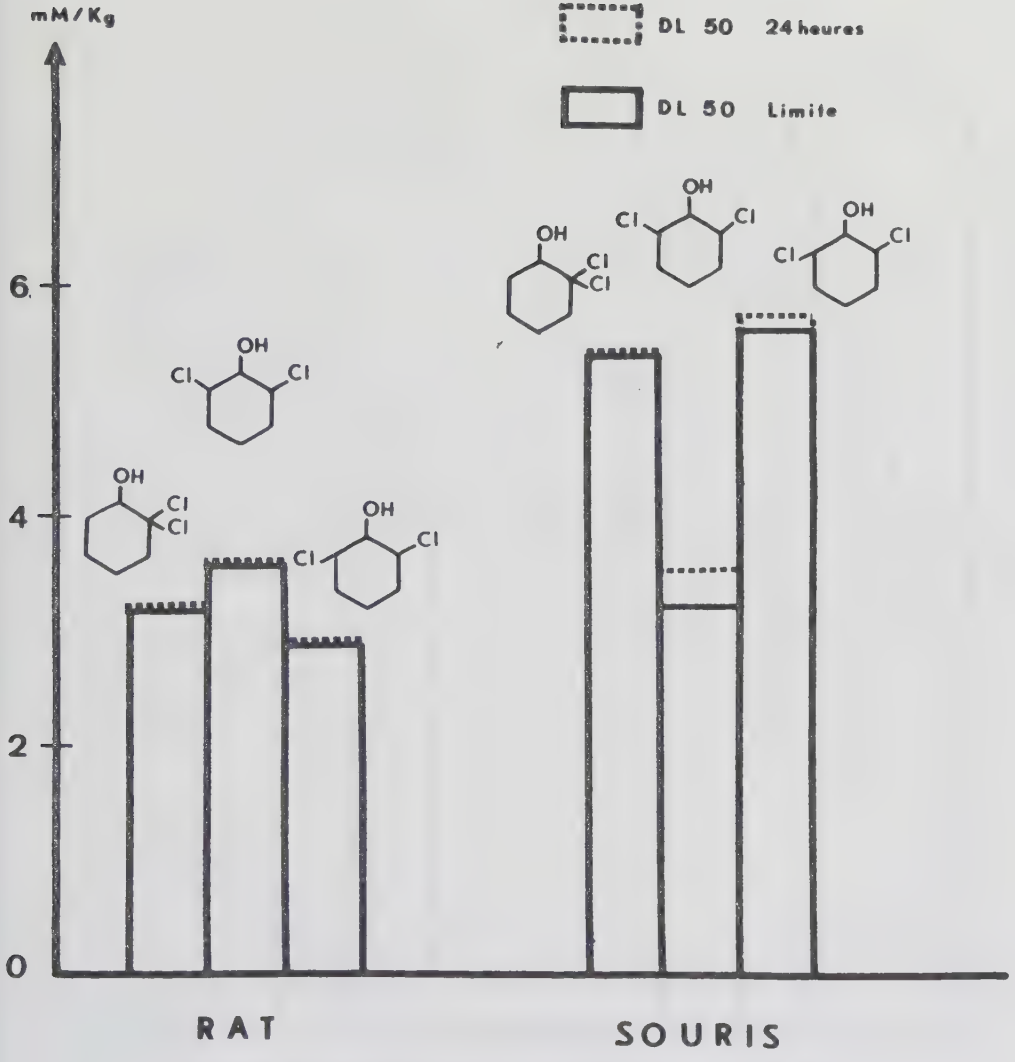
GRAPHIQUE N° 8

Toxicité immédiate et différée des dichlorocyclohexanones géminée, cis et trans à l'égard du Rat et de la Souris.
(Voie I. P.)



GRAPHIQUE N° 9

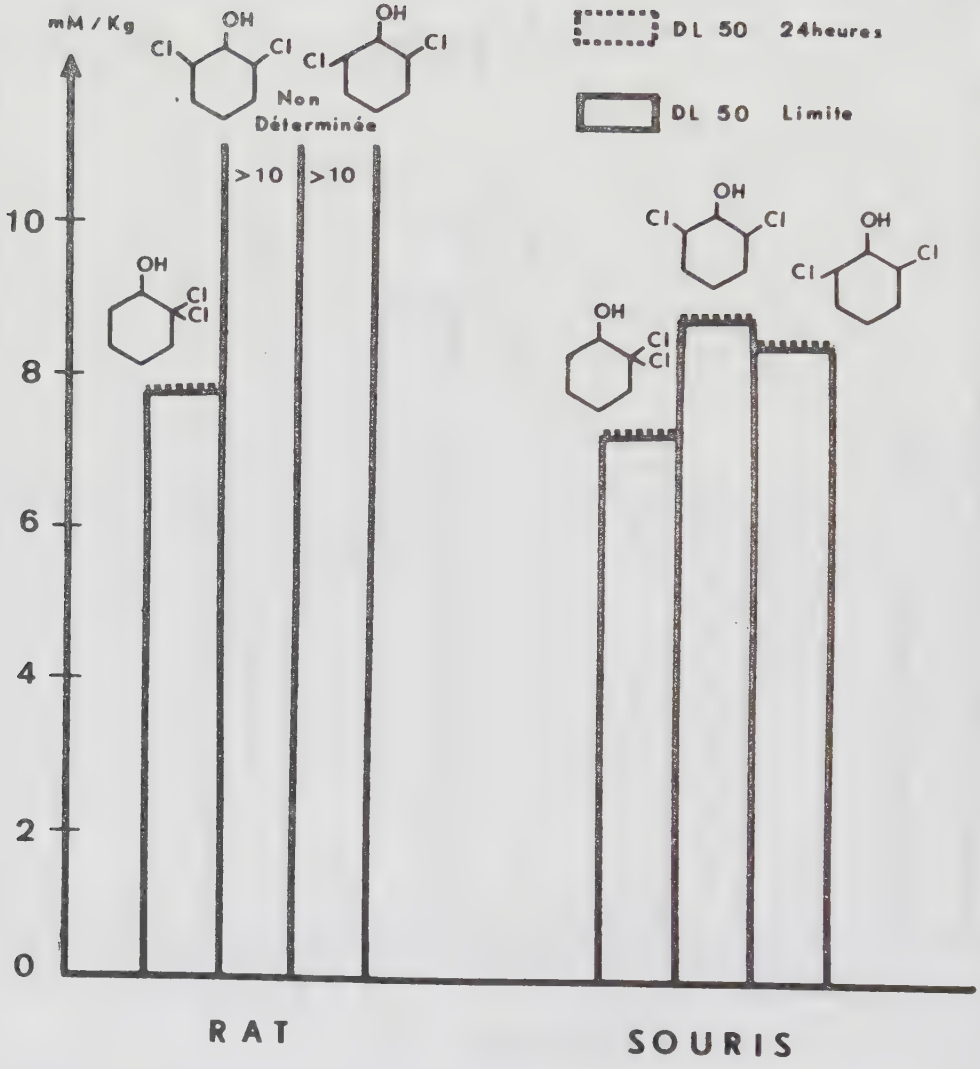
Toxicité immédiate et différée des dichlorocyclohexanones géminée, cis et trans à l'égard du Rat et de la Souris.
(Voie P. O.)



GRAPHIQUE N° 10

Toxicité immédiate et différée des dichlorocyclohexanols géminé, cis-cis et cis-trans à l'égard du Rat et de la Souris.

(Voie I. P.)



GRAPHIQUE N° 11

Toxicité immédiate et différée des dichlorocyclohexanols géminé, cis-cis et cis-trans à l'égard du Rat et de la Souris.

(Voie P. O.)

2 - Toxicité différée

Le tableau présenté ci-dessous situe les valeurs des rapports :

$$\frac{\text{D.L. 50 24 h}}{\text{D.L. 50 limite}} \quad \text{et} \quad \frac{\text{D.M.J.M. 24 h}}{\text{D.I.L.}}$$

qui témoignent de la toxicité distale des substances étudiées.

SOURIS

		I.P.		P.O.	
		DL 50 24 h / DL 50 limite	DMJM 24 h / DIL	DL 50 24 h / DL 50 limite	DMJM 24 h / DIL
CETONES	GEMINEE	1,04	1,04	1,1	1,7
	CIS	2,2	3,04	1,1	1
	TRANS	2,8	4	1,4	1
ALCOOLS	GEMINE	1	1	1	1
	CIS-CIS	1,1	1	1	1
	CIS-TRANS	1,1	1	1	1
		RAT			
CETONES	GEMINEE	1,1	1,1	1	1
	CIS	5,3	14,6	1,1	1
	TRANS	3,4	4,5	1,2	1
ALCOOLS	GEMINE	1	1	1	1
	CIS-CIS	1	1		1
	CIS-TRANS	1	1		1

Les trois alcools isomères conduisent à des observations très homogènes : ils ne déterminent aucune toxicité différée quelle que soit la voie d'administration ; passé le délai de 24 heures, il est rare d'enregistrer d'autre exitus.

L'administration intrapéritonéale et per orale de dichlorocyclohexanone géminée conduit à la détermination de caractéristiques numériques très peu écartées. Le nombre d'animaux qui succombent après 24 heures demeure restreint.

Administrées par la voie intrapéritonéale, les dichlorocyclohexanones cis et trans conduisent à l'observation d'une toxicité différée, particulièrement remarquable chez le Rat.

L'écart entre les D. L. 50 24 heures et limite est très sensible, l'écart entre les doses 0% mortelles encore plus accusé. Les temps de crise demeurent toujours allongés (de l'ordre de 7 à 8 jours).

Administrés par la voie per orale, ces produits ne manifestent qu'une très faible toxicité différée.

3 - Influence de la voie d'administration sur la toxicité.

A échéance immédiate comme à échéance différée, la voie intrapéritonéale se montre toujours la plus meurtrière, malgré l'absence de réaction locale au point d'injection.

Cependant, une particularité intéresse la dichlorocyclohexanone géminée et les dichlorocyclohexanols cis-trans et géminé : par la voie intrapéritonéale la Souris tolère les doses de ces substances supérieures aux doses infraléthales déterminées par la voie per orale.

4 - Toxicité comparée à l'égard des deux espèces animales.

Les résultats obtenus diffèrent selon la voie d'administration.

α) *CETONES*

* Voie I. P.

Les isomères cis et trans manifestent une agressivité comparable à l'égard du Rat et de la Souris ; l'isomère géminé se montre nettement plus toxique à l'égard du Rat.

* Voie P. O.

Les trois isomères présentent une toxicité plus élevée pour la Souris que pour le Rat.

Avec l'isomère géminé cette observation revêt un caractère particulièrement marqué.

β) *ALCOOLS*

* Voie I. P.

La toxicité de l'isomère cis-cis ne paraît pas sensiblement différente à l'égard des deux espèces animales.

Par contre les isomères cis-trans et géminé se montrent plus agressifs pour le Rat que pour la Souris.

* Voie P. O.

L'isomère géminé manifeste un comportement comparable à l'égard du Rat et de la Souris. Cette dernière espèce se montre nettement plus sensible à l'agression par les isomères cis-cis et cis-trans.

5 - Influence de la réduction sur la toxicité immédiate et différée des dichlorocyclohexanones.

Nous avons vu précédemment (1ère partie p.12) que les méthodes classiques de la réduction des composés cétoniques appliquées aux dichlorocyclohexanones conduisaient :

- à l'alcool géminé dans le cas de la dichlorocyclohexanone géminée.

- en majeure partie à l'alcool cis-cis dans le cas de la dichlorocyclohexanone cis,

- à l'alcool cis-trans dans le cas de la dichlorocyclohexanone trans.

Ce fait nous permet de confronter les effets déterminés par l'intoxication à chacune des dichlorocyclohexanones envisagées et ceux déterminés par le dichloroalcool provenant de sa réduction. Nous avons établi pour chaque couple dichloroalcool-dichlorocétone la valeur du rapport des D. L. 50 déterminé au bout de 24 heures et du temps de crise.

DL 50 Alcool / DL 50 Cétone		SOURIS		RAT	
		I.P.	P.O.	I.P.	P.O.
Alcool gém.	à 24 h	0,95	0,76	0,81	0,51
Cétone gém.	au T.C.	0,98	0,86	0,89	0,51
Alcool cis-cis	à 24 h	1,95	2,93	2,23	
Cétone cis	au T.C.	4,08	3,42	12,00	
Alcool cis-trans	à 24 h	5,08	3,50	2,92	
Cétone trans	au T.C.	14,30	4,95	10,00	

Isomère géminé : si l'on considère l'administration par la voie I.P., la réduction ne modifie sensiblement pas la toxicité de la dichlorocyclohexanone géminée à l'égard de la Souris, elle augmente légèrement la toxi-

cité à l'égard du Rat.

Par contre si l'on considère l'administration per orale, la réduction augmente légèrement la toxicité à l'égard de la Souris, double la toxicité à l'égard du Rat.

Isomère cis : la réduction de la dichlorocyclohexanone cis provoque une nette diminution de la toxicité, quel que soit l'animal éprouvé et quelle que soit la voie d'introduction empruntée. Il convient de souligner que ce fait est toujours observé avec une plus grande intensité au temps de crise et plus particulièrement chez le Rat.

Isomère trans : la réduction atténue considérablement l'agressivité de la dichlorocyclohexanone trans aussi bien à l'égard de la Souris qu'à l'égard du Rat. Au temps de crise, l'écart entre les D.L. 50 caractérisant, la toxicité de la cétone et celle de l'alcool se montre encore plus considérable.

En outre, le seuil de la léthalité s'établit pour des doses 8 fois plus élevées (D.M.J.M. 24 h) et 30 fois plus élevées (D.I.L.) dans le cas de la dichlorocyclohexanone. Les résultats ne semblent pas être en corrélation avec les valeurs des temps de crise qui se montrent beaucoup plus faibles après l'administration de dichlorocyclohexanol.

L'ensemble de ces observations sur le Rat et sur la Souris permet de formuler la conclusion suivante : la réduction des trois dichlorocétones envisagées diminue d'autant plus la toxicité que celle-ci est plus élevée.

6 - Influence de la chloruration sur la toxicité immédiate et différée.

Nous avons réuni dans les tableaux n° 7 et 8 les caractéristiques numériques intéressant la toxicité

proximale et distale de la cyclohexanone et du cyclohexanol, en regard des valeurs correspondantes qui caractérisent respectivement leurs homologues α mono et dichlorés (voie I.P.).

Le tableau n° 9 rend compte de l'influence de la chloruration et de celle de la réduction sur la toxicité de la cyclohexanone (voie I.P. et P.O.).

- La monochloruration en α renforce notablement la toxicité de la cyclohexanone quelle que soit la voie d'administration. Par contre l'addition en position α d'un atome de chlore sur le cyclohexanol, réalisée aussi bien en position cis qu'en position trans, diminue légèrement la toxicité par la voie intrapéritonéale ; par la voie per orale la toxicité se montre au contraire légèrement plus élevée.

- L'addition d'un deuxième atome de chlore sur la chloro-2-cyclohexanone, si elle se réalise en position αα, diminue légèrement la toxicité de la chloro-2-cyclohexanone (la dichlorocyclohexanone géminée demeurant nettement plus agressive que la cyclohexanone). Par contre l'addition d'un deuxième atome de chlore en position αα' renforce considérablement la toxicité de la chloro-2-cyclohexanone, aussi bien lorsque la configuration spatiale de la molécule s'oriente vers la forme trans que vers la forme cis.

La même observation n'est pas renouvelée si l'on considère les effets de la chloruration des cis et trans chloro-2-cyclohexanols : l'apport d'un 2ème atome de chlore confère à chacune de ces deux molécules un renforcement beaucoup moins net de la toxicité, quelle que soit la configuration spatiale atteinte : cis-cis, cis-trans ou géminé.

La tendance suivante semble donc pouvoir se dégager de nos observations : la monochloruration de la cyclohexanone renforce nettement la toxicité de cette molécule ; l'addition d'un deuxième atome de

TABLEAU N° 7 Voie I. P.

Substances Administrées	D.M.J.M. 24 h g/kg		D.L. 50 24 h g/kg		D.I.L. g/kg		D.L. 50 limite g/kg		Temps de crise jours	
	Souris	Rat	Souris	Rat	Souris	Rat	Souris	Rat	Souris	Rat
Cyclohexanol	0,83	0,50	1,04	0,78	0,35	0,25	0,68	0,56	12 j.	10 j.
Chloro-2-cyclohexanol Cis	1,0	0,54	1,3	0,95	0,89	0,54	1,2	0,70	7 j.	28 j.
Chloro-2-cyclohexanol Trans	0,84	0,42	1,2	0,89	0,84	0,38	1,1	0,65	10 j.	18 j.
Dichlorocyclohexanol Géminé	0,79	0,29	0,91	0,53	0,79	0,29	0,91	0,53	24 h.	24 h.
Dichlorocyclohexanol Cis-Cis	0,41	0,37	0,61	0,60	0,41	0,37	0,56	0,60	3 j.	24 h.
Dichlorocyclohexanol Cis-Trans	0,81	0,35	0,97	0,48	0,81	0,35	0,96	0,48	4 j.	24 h.

TABLEAU N° 8 Voie I. P.

Substances Administrées	D.M.J.M. 24 h g/kg		D.L. 50 24 h g/kg		D.I.L. g/kg		D.L. 50 limite g/kg		Temps de crise jours	
	Souris	Rat	Souris	Rat	Souris	Rat	Souris	Rat	Souris	Rat
Cyclohexanone	1,2	0,50	1,35	0,89	0,60	0,50	1,23	0,84	4 j.	3 j.
Chloro-2-cyclohexanone	0,5	0,08	0,83	0,57	0,35	0,08	0,53	0,38	5 j.	8 j.
Dichlorocyclohexanone Géminée	0,73	0,45	0,95	0,65	0,70	0,41	0,91	0,59	3 j.	9 j.
Dichlorocyclohexanone Cis	0,18	0,19	0,31	0,27	0,062	0,013	0,13	0,05	4 j.	7 j.
Dichlorocyclohexanone Trans	0,10	0,099	0,19	0,16	0,025	0,022	0,067	0,048	7 j.	6 j.

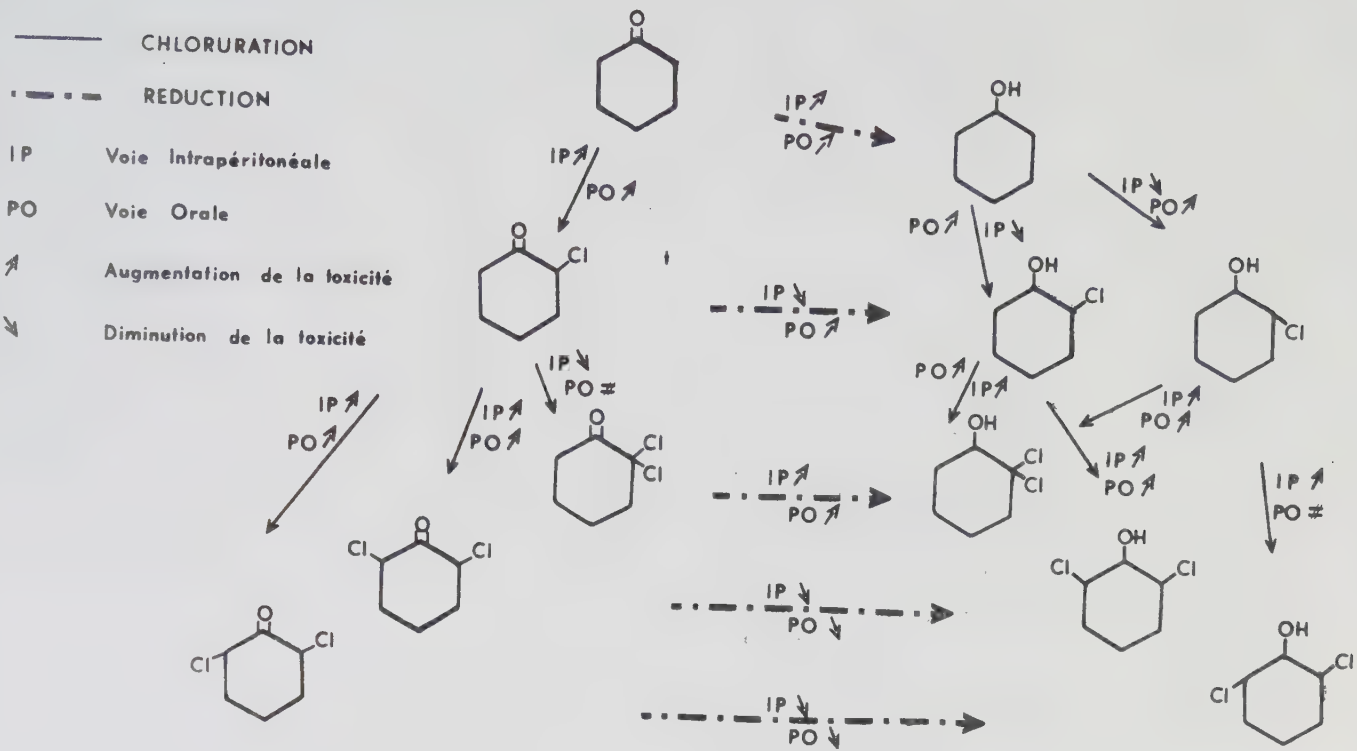


TABLEAU N° 9

Influence de la chloruration et de la réduction sur la toxicité de la cyclohexanone à l'égard du Rat et de la Souris.

chlore détermine des effets comparables si elle conduit aux formes αα', des effets très atténués si elle conduit à la forme αα.

Par contre les effets de la monochloruration sur la toxicité du cyclohexanol sont peu marqués (CAHUZAC A.M. et al., 1970). Mais l'addition d'un deuxième atome de chlore, surtout si elle conduit aux formes αα', fait réapparaître le renforcement de la toxicité.

S'il ne semble pas permis d'établir la corrélation entre ces faits et les valeurs du temps de crise enregistrées lors de l'intoxication par les dérivés cétoniques, il est remarquable de constater que, pour les dérivés alcooliques, le renforcement de la toxicité sous l'influence de la chloruration s'accompagne le plus souvent d'une large diminution de la valeur du temps de crise. Par contre lorsque la toxicité se montre peu influencée par l'apport d'un atome de chlore, les valeurs des temps de crise se montrent sensiblement identiques.

En conclusion : de notre étude se dégagent les points essentiels suivants :

- le dérivé dichloré géminé, particulièrement dans le cas des cétones, se distingue nettement des dérivés αα' ;

- les alcools géminé et cis-trans présentent de nombreux points communs.

chlore déterminé des effets comparables si elle conduit aux formes cu', des effets très atténués si elle conduit à la forme cu.

Par contre les effets de la monochloration sur la toxicité du cyclohexanol sont peu marqués (CAHUZAC A.M. et al., 1970). Mais l'addition d'un deuxième atome de chlore, surtout si elle conduit aux formes cu', fait réapparaître la [illegible] té.

S'il ne semble pas permis d'établir la corrélation entre ces faits et les valeurs du temps de crise enregistrées lors de l'intoxication par les dérivés cétoniques, il est remarquable de constater que, pour les dérivés alcooliques, le remplacement de la troisième [illegible] l'influence de la chloruration s'accompagne [illegible] vent d'une large diminution de la valeur du temps de crise. Par contre lorsque la chloricité se montre peu [illegible] [illegible] l'apport d'un [illegible] les valeurs des temps de crise se montrent [illegible] inertes.

En conclusion : de notre étude se dégagent les points essentiels suivants :

- le dérivé dichloré [illegible], particulièrement dans le cas des cétones, se distingue nettement des dérivés cu' ;

- les alcools [illegible] [illegible] de nombreux points communs.

TROISIEME PARTIE

ETUDE PHARMACODYNAMIQUE

L'étude pharmacodynamique a été engagée uniquement chez la Souris. En effet les faibles quantités de produits dont nous disposions ne nous permettaient pas d'envisager une étude chez le Rat.

CHAPITRE I

EFFETS HYPOTHERMISANTS

La symptomatologie de l'intoxication aux dichlorocyclohexanones et aux dichlorocyclohexanols a révélé, plus particulièrement chez la Souris, un état hypothermique plus ou moins profond. Cette observation nous a incités à étudier comparativement l'action de chaque substance sur la température centrale de cet animal.

A) Protocole expérimental

Les mesures de la température centrale sont réalisées à l'aide du couple thermoélectrique ELLAT type TE_3 équipé d'électrodes spéciales pour Souris type RM_4 de 2 mm de diamètre. La lecture s'effectue 2 secondes après l'introduction rectale du thermocouple.

CAUJOLLE F. et MEYNIER D., 1960, ont défini les conditions indispensables à une détermination rigoureuse des variations de la température centrale : " Tous les animaux doivent être testés, isolés, au repos, à une température bien définie et toujours la même comprise entre 24 et 26°C".

La sélection des animaux doit permettre de retenir pour l'expérimentation des sujets dont la température centrale varie de 37,9 à 38,6°C. "Toute baisse thermique inférieure en valeur absolue à 1°C sera tenue pour non significative".

* Avant l'administration du produit, la valeur de la température centrale est déterminée par trois mesures de la température rectale réalisées à 10 minutes d'intervalle. On élimine les animaux dont la température s'écarte des valeurs précédemment fixées, ainsi que ceux dont la température centrale présente entre deux mesures un écart supérieur à 1°C.

Les animaux sélectionnés ont été répartis en lots constitués par 5 mâles et 5 femelles (sujets traités) ou 3 mâles et 3 femelles (sujets témoins).

Les sujets traités ont reçu par la voie intrapéritonéale les solutions huileuses à 5% (H.O.N.) de chaque substance envisagée. Les sujets témoins ont reçu 0,20 ml d'H.O.N. par la même voie d'administration.

* Après l'administration du produit, la valeur de la température centrale est estimée toutes les 15 minutes pendant la première heure, puis toutes les 30 minutes jusqu'à la troisième heure, enfin toutes les heures de la troisième à la septième heure.

B) Résultats expérimentaux

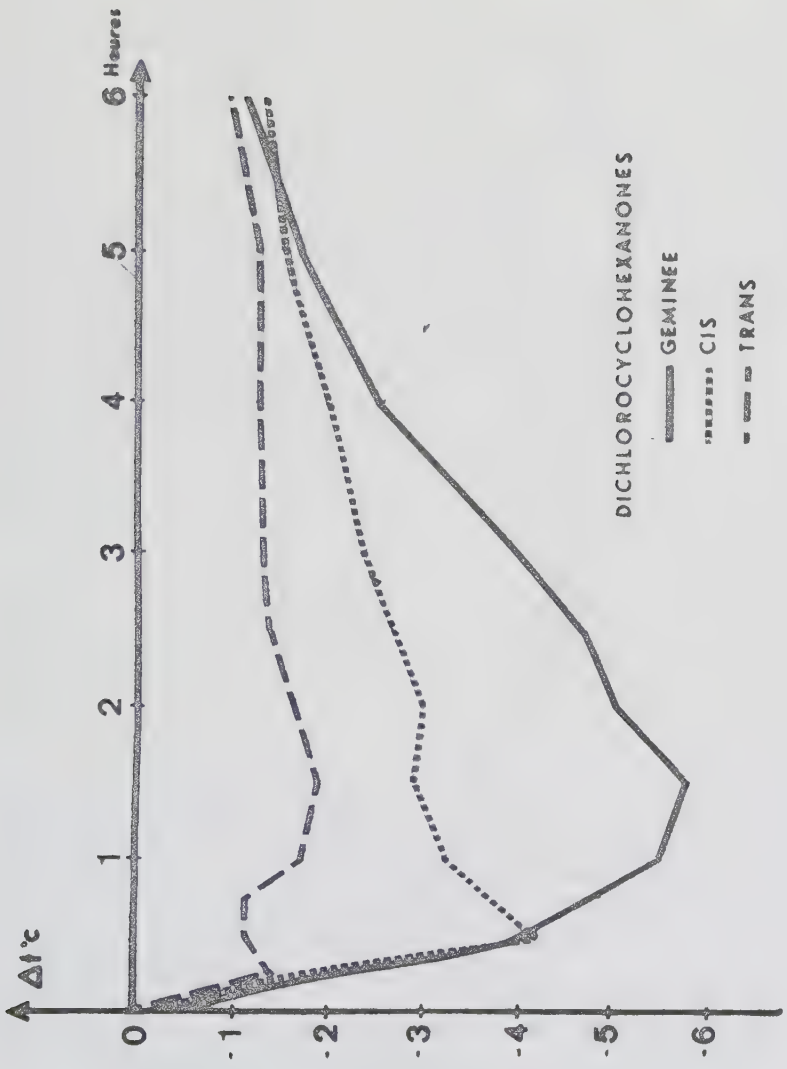
Aucune différence significative d'efficacité n'a été observée dans les réponses enregistrées chez les mâles et chez les femelles. Ce fait nous a permis de réunir sur le même graphique les variations de la température centrale (Δt, exprimée en °C) en fonction du temps (t), déterminées chez les animaux des deux sexes (graphiques n° 12 et 13 - tableau n°10).

TABLEAU N° 10

EFFETS HYPOTHERMISANTS DES DICHLOROCYCLOHEXANOLS

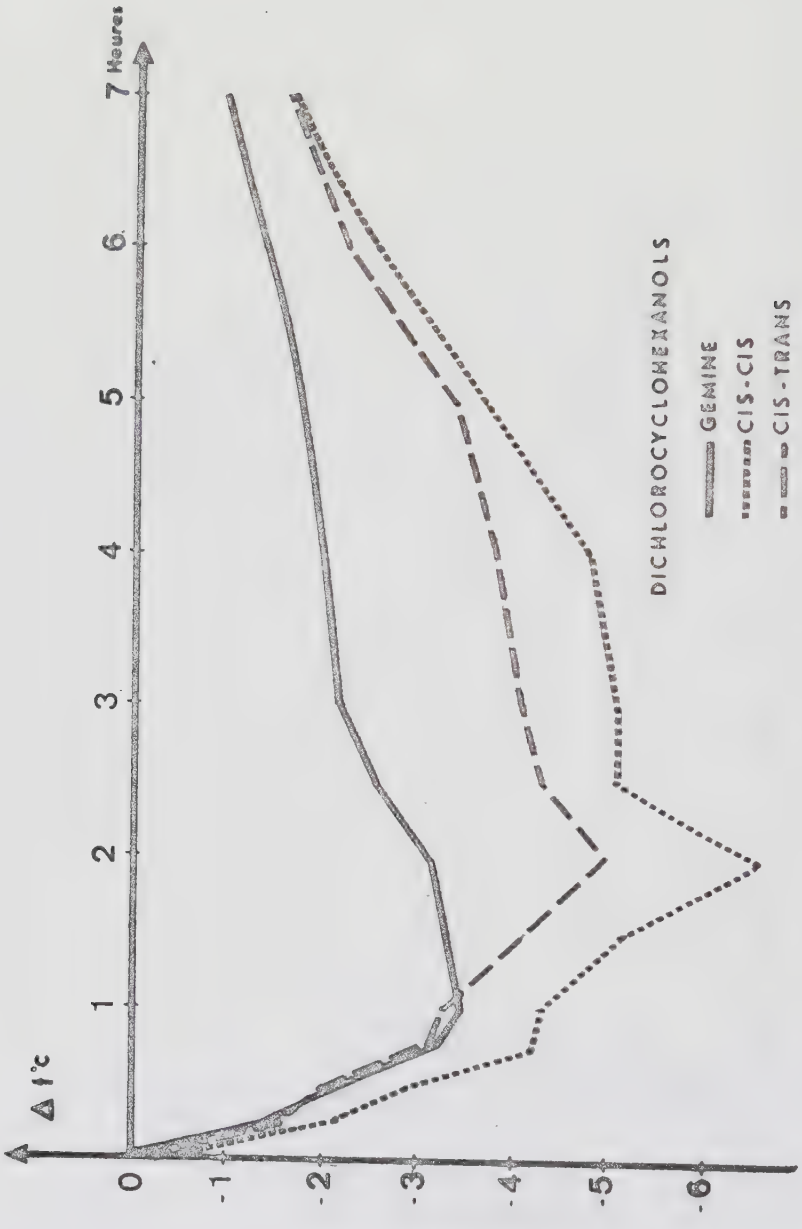
VIS A VIS DE LA SOURIS (voie I.P. sol. 5% H.O.N.)

	Dichlorocyclohexanol Géminé		Dichlorocyclohexanol Cis-Cis		Dichlorocyclohexanol Cis-Trans	
Dose = g/kg	0,79 (D.I.L.)	0,264 (1/3 D.I.L.)	0,41 (D.I.L.)	0,136 (1/3 D.I.L.)	0,81 (D.I.L.)	0,27 (1/3 D.I.L.)
Chute thermique maximale (°C)	-3,6	-1,5	-6,6	-5,6	-5	-4,5
Enregistrée après	60 min.	30 min.	2 h.	90 min.	2 h.	45 min.
Durée	6 h.	2 h.	7 h.	6 h.	7 h.	5 h.



GRAPHIQUE N° 12

Effets des dichlorocyclohexanones sur la thermorégulation de la Souris.
(Voie I.P. - D.I.L.)



GRAPHIQUE N° 13

Effets des dichlorocyclohexanols sur la thermorégulation de la Souris.
(Voie I.P. - D.I.L.)

α) *Dichlorocyclohexanones*

L'administration de doses infraléthales des 3 isomères des dichlorocyclohexanones détermine des effets variables : l'ordre d'activité s'établit ainsi pour les 3 isomères,

Trans // Cis / Géminé.

La dichlorocyclohexanone trans manifeste des effets hypothermisants très discrets : la chute thermique maximale de l'ordre de 1,7°C, est enregistrée au bout de 1 h 30 ; la température initiale se récupère complètement 4 heures après l'administration du produit.

La dichlorocyclohexanone cis détermine une hypothermie prompte à s'installer, qui atteint sa valeur maximale ($\Delta t = -4,2°C$) après 30 minutes ; le retour à la température primitive se réalise au bout de 5 heures.

La dichlorocyclohexanone géminée se comporte comme un hypothermisant net : la température centrale subit un abaissement de l'ordre de 5,8°C enregistré après 90 minutes ; elle retrouve sa valeur initiale après 6 heures.

Après l'administration de doses inférieures à l'infraléthale, seule la dichlorocyclohexanone géminée a déterminé une chute significative de la température centrale ($\Delta t = -3,2°C$ après 30 minutes pour une dose égale à la moitié de la D.I.L.). L'hypothermie observée dans ces conditions se montre moins durable (retour à la température initiale après 2 heures).

β) *Dichlorocyclohexanols*

Le tableau n°10 présente les résultats atteints après épreuve aux trois dichlorocyclohexanols.

Administrés à la dose infraléthale, les dichlorocyclohexanols cis-cis et cis-trans, déterminent des

effets assez comparables : l'hypothermie, lente à s'installer, atteint sa valeur maximale au bout de 2 heures ; le retour à la température primitive se réalise dans les mêmes limites pour les deux isomères.

Le dichlorocyclohexanol géminé se comporte comme un hypothermisant plus direct ; ses effets se manifestent de façon précoce et s'avèrent de courte durée.

L'administration de doses inférieures à l'infraléthale (voisine du 1/3 de la D.I.L.) ne révèle que des effets très discrets pour le dichlorocyclohexanol géminé ; par contre pour les deux autres isomères on observe une activité assez proche de celle déterminée à la dose infraléthale.

L'ordre d'activité hypothermisante croissante s'établit ainsi pour les trois isomères

Géminé // Cis-Trans / Cis-Cis

C) Conclusions

Les résultats atteints témoignent d'assez peu d'homogénéité si l'on considère l'activité des dichlorocétones en regard de celle des dichloroalcools : en effet si la dichlorocyclohexanone géminée manifeste des effets plus intenses que ceux du dichlorocyclohexanol géminé, les dichlorocyclohexanones cis et trans se montrent moins actives que les dichloroalcools correspondants.

Notons que les effets du dichlorocyclohexanol cis-cis sont plus longs à se manifester que ceux de la dichlorocétone correspondante.

CHAPITRE II

EFFETS HYPNOTIQUES
EFFETS RENFORCATEURS A L'EGARD DE L'HEXOBARBITAL

La symptomatologie de l'intoxication par les dichlorocyclohexanones et par les dichlorocyclohexanols a révélé chez certains dérivés l'apparition d'un état narcotique plus ou moins profond.

Ce fait nous a incité à envisager plus systématiquement les effets hypnotiques de chacune des substances étudiées ainsi que leurs effets renforçateurs à l'égard des barbituriques.

I - EFFETS HYPNOTIQUES

Les effets hypnotiques propres des 6 produits envisagés ont été étudiés chez la Souris.

A) Protocole expérimental

Le critère du "sommeil" retenu se caractérise par la perte du réflexe de redressement : chute de l'animal en décubitus ventral ou latéral ou impuissance de l'animal à se redresser si on le place sur le flanc. On ne considère que les animaux ayant perdu le réflexe de redressement pendant au moins une minute. La dépression centrale peut être plus ou moins intense ; il convient donc d'éviter toute perturbation pouvant nuire à l'installation du sommeil ou en interrompre le cours.

Nous avons adopté le protocole suivant :

Les animaux soumis à cette épreuve sont placés dans des cages individuelles, dans une pièce silencieuse, et observés pendant toute la durée de l'épreuve (jusqu'à la récupération du réflexe de redressement).

La température de la pièce, maintenue constante,

est comprise entre 22° et 24°C.

Des lots de 5 sujets mâles et 5 sujets femelles sont établis, et chaque sujet est logé dans une boîte en polyvinyle capitonnée de coton hydrophile.

Les substances étudiées, mises en solution à 5% dans l'H.O.N. sont administrées par la voie I.P.

Dès la fin de l'injection, on évalue chronométriquement le temps de latence qui s'écoule avant la perte du réflexe de redressement ainsi que la durée du sommeil.

Après avoir déterminé la valeur de la dose inefficace (DE 0 = dose maximale jamais hypnotique) et celle de la dose 100% efficace (DE 100 = dose minimale toujours hypnotique), nous avons administré des doses intermédiaires équidistantes suivant l'échelle logarithmique à base 10.

La valeur de la dose 50% efficace (DE 50) et ses limites de confiance au seuil 5% ont ensuite été établies en ayant recours à la méthode de calcul déjà utilisée pour la détermination des DL 50 (p.23).

Pour chaque dose essayée, nous avons établi la valeur moyenne du temps de latence précédent la perte du réflexe de redressement ainsi que la valeur moyenne de la durée du sommeil.

L'examen des résultats concernant la durée du sommeil nous a conduit à établir une relation mathématique simple entre la dose administrée (exprimée en g/kg) et la durée de la narcose (exprimée en minutes).

Les valeurs du logarithme de t et du logarithme de d ont été utilisées en vue de tracer les points expérimentaux représentatifs de la variation

de t en fonction de d ; nous avons alors cherché une relation linéaire modèle mathématique le plus simple. Nous avons ensuite hâté l'ajustement linéaire envisagé par la méthode des polynômes orthogonaux de FISHER (FISHER R. A., 1925).

Un nuage de n points peut être parfaitement ajusté par une expression polynômiale de degré n. Mais une courbe de ce type demeure complexe ; de plus cet ajustement n'élimine pas les erreurs aléatoires qui entachent naturellement les mesures. Nous avons de ce fait recherché une expression polynômiale de degré inférieur à n pour laquelle le résidu, suffisamment petit, permette un ajustement satisfaisant. Les polynômes orthogonaux de FISHER facilitent les calculs.

Lorsque l'ajustement linéaire de la relation dose-effet peut être admis, ce qui se traduit par l'équation suivante :

$$\log t = \alpha \log d + k$$

il est permis de conclure que la durée est liée à la dose par la formule suivante :

$$t = k\, d^{\alpha}$$

B) Résultats expérimentaux

Les résultats que nous avons obtenus sont consignés dans le tableau n° 11.

Les valeurs du temps de latence et les valeurs de la durée du sommeil qui figurent dans ce tableau, traduisent les effets enregistrés après l'administration de doses situées dans l'intervalle des limites de confiance de la DE 50.

Chaque fois que cela a été possible, l'ajustement linéaire de la relation dose-durée de la narcose a été établi et nous avons porté dans le tableau les valeurs obtenues à partir de l'équation $t = k\, d^{\alpha}$ pour d = DE 50.

Le graphique n° 14 rend compte de la valeur du rapport $R = \frac{DE\ 50}{D.I.L.}$ qui constitue l'expression de l'index chimiothérapeutique de la substance envisagée.

Nos essais ont fait apparaître que seuls, la dichlorocyclohexanone géminée et les trois dichlorocyclohexanols isomères sont susceptibles de déterminer la perte du réflexe de redressement chez la Souris.

L'ordre d'activité hypnotique croissante s'établit ainsi pour les trois alcools :

Cis-Cis // Géminé # Cis-Trans

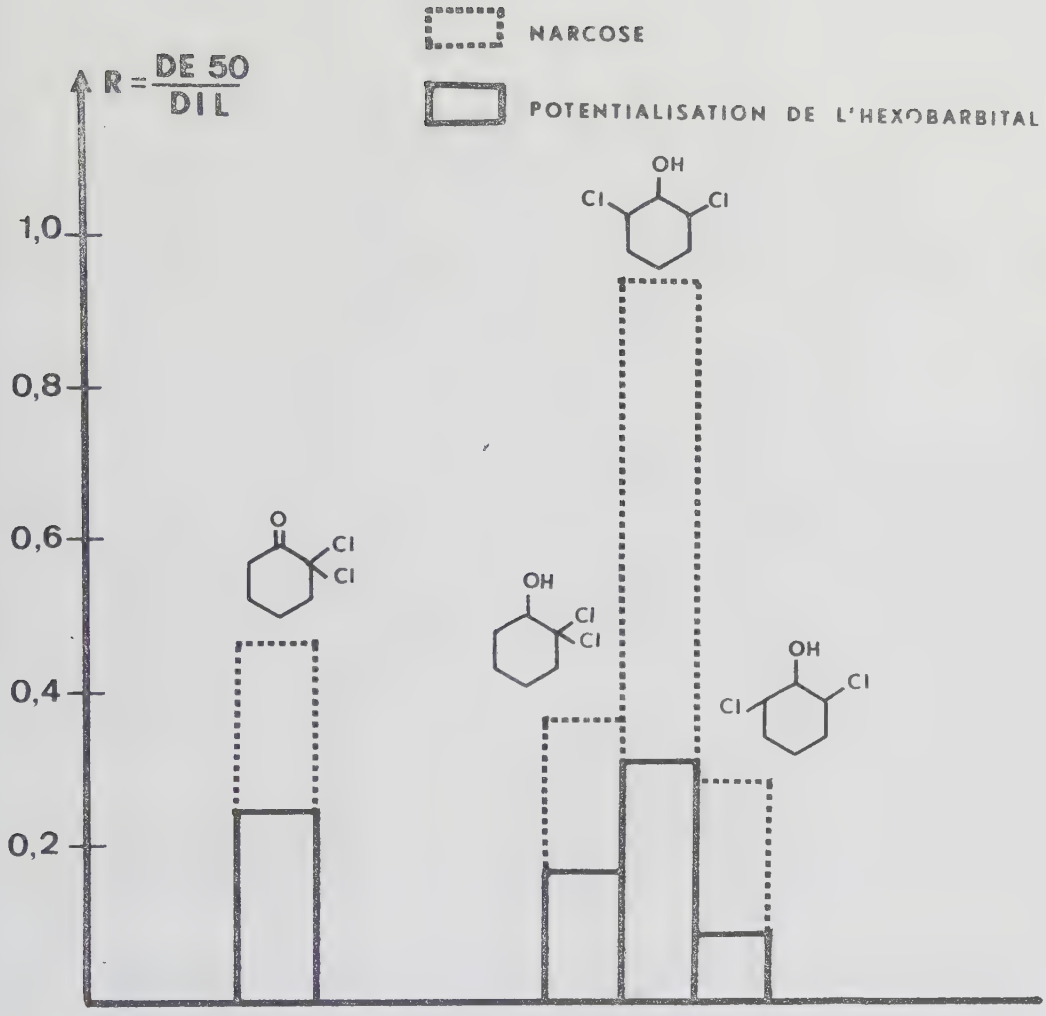
L'activité de la dichlorocyclohexanone géminée se montre légèrement inférieure à celle du dichlorocyclohexanol géminé.

Le dichlorocyclohexanol cis-cis ne manifeste d'activité qu'à des doses voisines de l'infraléthale (il faut dépasser le seuil de la toxicité pour atteindre la DE 100).

L'écart entre les doses limites de l'activité se montre assez faible surtout dans le cas de l'isomère géminé (aussi bien dichlorocétone que dichloroalcool).

Le temps de latence qui précède l'abolition du réflexe de redressement se situe entre 8 et 15 minutes. Seul le dichlorocyclohexanol cis-cis exige près de 30 minutes pour manifester son activité hypnotique.

Il n'a pas été possible d'établir un ajustement linéaire de la relation dose-effet dans le cas de la narcose induite par la dichlorocyclohexanone géminée et le dichlorocyclohexanol cis-cis ; pour ces deux substances nous avons porté dans le tableau la valeur moyenne des durées du sommeil enregistrées après administration de doses situées dans l'intervalle des limites de confiance de la DE 50.



GRAPHIQUE N° 14

Effets hypnotiques de la dichlorocyclohexanone géminée et des dichlorocyclohexanols géminé, cis-cis et cis-trans. (Souris-I.P.)

TABLEAU N° 11

EFFETS HYPNOTIQUES

(Souris I.P. sol.5% H.O.N.)

Produit administré	DE 0	DE 100 g/kg	DE 50	R= DE 50 / D.I.L.	Temps de latence moyen	Durée
Dichlorocyclohexanone Géminée	0,30	0,44	0,330 (0,311-0,353)	0,42	14 min.	53 min.
Dichlorocyclohexanol Géminé	0,25	0,37	0,298 (0,284-0,312)	0,37	12 min.	33 min. (26-41)
Dichlorocyclohexanol Cis-Cis	0,29	0,48	0,39 (0,37-0,41)	0,95	27 min.	120 min.
Dichlorocyclohexanol Cis-Trans	0,17	0,39	0,26 (0,23-0,28)	0,30	8 min.	45 min. (26-70)

Dans le cas de la narcose induite par le dichlorocyclohexanol cis-cis, il est intéressant de noter que la perte du réflexe de redressement se maintient de façon tout à fait comparable aussi bien pour des doses voisines de la DE 0 que pour des doses voisines de la DE 100.

II - POTENTIALISATION DE L'HEXOBARBITAL

A) Protocole expérimental

Les substances étudiées ont manifesté certains effets hypothermisants à l'égard de la Souris ; ce fait permet de prévoir, chez cet animal, une action freinatrice sur le métabolisme basal et par voie de conséquence sur le métabolisme hépatique des substances introduites dans l'organisme à posteriori. Ainsi, l'hexobarbital, métabolisé en grande partie par les microsomes hépatiques, peut voir prolonger son séjour dans l'organisme, ce qui aura pour conséquence, d'augmenter la durée de ces effets.

Afin d'éviter l'interférence de ce phénomène, nous avons adopté la technique que WYLIE (WYLIE D.W., 1958) a décrite pour l'étude de la potentialisation des barbituriques par une substance hypothermisante.

Cet auteur propose d'administrer la substance hypothermisante à des doses non hypnotiques et après un certain délai fixé pour chaque substance à étudier, d'administrer le barbiturique à la dose subliminaire de son activité.

On note le pourcentage d'animaux chez lesquels apparaît le sommeil potentialisé. La dose subliminaire du barbiturique, administrée à la Souris par la voie intrapéritonéale, a été déterminée sur des lots homogènes constitués par 5 mâles et 5 femelles. La dose de 0,040g/kg s'est toujours révélée inactive aussi bien chez les sujets neufs que chez les sujets ayant reçu 30 minutes auparavant 0,20 ml d'H.O.N. par la voie intrapéritonéale.

Les conditions expérimentales ont été les mêmes que celles que nous avons décrites pour l'étude des effets hypnotiques propres des substances envisagées.

L'hexobarbital est mis en solution à 1 % dans le sérum physiologique.

Des lots constitués par 5 mâles et 5 femelles reçoivent la substance à étudier par la voie intrapéritonéale, respectivement, 90 minutes pour le dichlorocyclohexanol cis-cis et 30 minutes pour les autres produits, avant l'hexobarbital ; à cette échéance les effets centraux des substances étudiées se manifestent avec le maximum d'intensité.

On détermine les caractéristiques numériques de l'activité potentialisatrice (DE 0 - DE 100 - DE 50) en administrant des doses équidistantes selon l'échelle logarithmique à base 10.

B) Résultats expérimentaux

Les résultats que nous avons atteints figurent dans le tableau n° 12.

Administrées à la dose infraléthale, les dichlorocyclohexanones cis et trans ne potentialisent pas l'hexobarbital et il est nécessaire d'administrer des doses 10 % mortelles pour voir se manifester l'activité renforçatrice à l'égard des barbituriques.

La dichlorocyclohexanone géminée renforce les effets de l'hexobarbital à des doses infraléthales ; cependant il convient d'apporter certaines réserves : la DE 100 n'a pas pu être déterminée puisqu' elle s'est révélée supérieure à la dose liminaire de l'activité hypnotique propre de ce produit.

Les trois dichlorocyclohexanols isomères manifestent des effets plus nets : l'ordre d'activité

TABLEAU N° 12

EFFETS RENFORCATEURS A L'EGARD DE L'HEXOBARBITAL

(Souris I.P. sol. 5% H.O.N.)

Produit administré	DE 0	DE 100 g/kg	DE 50	$R = \frac{DE\ 50}{D.I.L.}$	Temps de latence	Durée
Dichlorocyclohexanone Géminée	0,070	non déterminée (sup. à la DE 0 narcose).	0,18 (0,15-0,22)	0,25	8 min.	23 min. (21-26)
Dichlorocyclohexanol Géminé	0,079	0,22	0,15 (0,14-0,17)	0,19	9 min.	25 min. (24-26)
Dichlorocyclohexanol Cis-Cis	0,034	0,29	0,13 (0,10-0,18)	0,32	6 min.	30 min. (28-33)
Dichlorocyclohexanol Cis-Trans	0,029	0,13	0,075 (0,06-0,09)	0,085	6 min.	23 min. (21-27)

potentialisatrice croissante s'établit ainsi :

Cis-Cis / Géminé // Cis-Trans

Cet ordre se montre identique à l'ordre d'activité hypnotique croissante, cependant deux points sont à noter : d'une part l'isomère cis-trans se montre ici notablement plus actif que l'isomère géminé, et d'autre part, l'écart s'est réduit entre l'activité de l'isomère géminé et celle de l'isomère cis-cis. Il convient de souligner qu'avec les quatre produits considérés, l'activité renforçatrice de l'hexobarbital se manifeste à des doses très faibles.

Aux doses voisines de la DE 50, le sommeil potentialisé apparaît après un temps de latence très comparable, (6 à 9 minutes), quelle que soit la substance administrée.

Il a été possible d'établir pour les quatre substances actives un ajustement linéaire de la relation dose-durée de la narcose.

La durée du sommeil se montre tout à fait comparable après administration de la DE 50 de chaque substance exerçant des effets renforçateurs à l'égard de l'hexobarbital.

III - CONCLUSIONS

Nos résultats ont fait apparaître que la dichlorocyclohexanone géminée est la seule substance parmi les trois dichlorocétones essayées qui présente une activité hypnotique propre et des effets renforçateurs vis à vis de l'hexobarbital.

Par contre les trois dichloroalcools isomères manifestent des effets hypnotiques propres, et potentialisent l'hexobarbital.

Il convient de noter que l'activité du dichlorocyclohexanol géminé se montre légèrement supérieure à

l'activité de la dichlorocyclohexanone géminée.

Ces faits pourront être éclairés à la lumière des résultats qui viendront en conclusion de notre étude du métabolisme des substances envisagées

La faible activité hypnotique du dichlorocyclohexanol cis-cis peut être rapprochée des manifestations convulsives qui ont caractérisé la symptomatologie de l'intoxication par cette substance.

Cette même observation nous incite à considérer les effets renforçateurs à l'égard de l'hexobarbital comme secondaires à la dégradation métabolique et non à une action primaire d'origine centrale (MULLEN J.O. et FOUTS J.R., 1965). La nette activité hypothermisante de l'isomère cis-cis peut être mise en cause, si nous admettons que la méthode proposée par WYLIE se montre dans les conditions expérimentales adoptées, incapable de pallier entièrement à cette éventualité.

CHAPITRE III

EFFETS ANTICONVULSIVANTS

Les effets hypothermisants et hypnotiques que nous avons enregistrés chez la Souris après administration de dichlorocyclohexanone géminée et des dichlorocyclohexanols géminé, cis-cis et cis-trans, traduisent une certaine activité dépressive à l'égard du système nerveux central. Nous avons essayé de déterminer si les substances proposées à notre étude étaient susceptibles d'exercer une action protectrice vis à vis de deux agents convulsivants de type différent : le pentétrazol et la strychnine.

Les effets convulsivants peuvent se manifester indépendamment

- à l'égard des crises convulsives (on peut observer une modification de la nature, de l'intensité, et du nombre des crises),
- à l'égard de la léthalité due à l'agent convulsivant.

Nous avons conduit notre étude chez la Souris.

I - EFFETS PROTECTEURS VIS A VIS DU PENTETRAZOL

A) Protocole expérimental

Le pentétrazol ("Cardiazol" S.E.P.S.) mis en solution à 2 % dans le soluté physiologique est administré à la Souris par la voie I.P. à la dose de 0,09 g/kg.

Après un temps de latence de 1 à quelques minutes, apparaîssent des crises convulsives typiques, avec phases cloniques et toniques, dont l'issue est presque toujours fatale.

La dose de pentétrazol retenue a provoqué l'apparition de crises convulsives chez 100 % des sujets éprouvés, après un temps de latence de 1 à 4 minutes. Ces crises ont abouti à la mort chez 92 % des sujets, après un délai moyen de 10 minutes. Ces résultats ont été obtenus chez des sujets témoins qui avaient reçu 0,20 ml d'H.O.N. par voie I.P., 30 minutes avant l'administration du pentétrazol.

Des lots homogènes constitués par 5 mâles et 5 femelles pesant de 21 à 26 g reçoivent la substance à étudier, mise en solution à 5 % dans l'H.O.N., par la voie I.P.. Après un délai variable - 90 minutes pour le dichlorocyclohexanol cis-cis, 30 minutes pour les autres substances - l'agent convulsivant est administré par la même voie.

Chaque sujet éprouvé est alors placé pendant la durée de l'observation, dans une petite cage en polyvinyle individuelle et tout excitus lui est, dans la mesure du possible évité.

On détermine chronométriquement le temps de latence précédent l'apparition de la première crise ainsi que le temps après lequel survient la mort.

Pour chaque dose administrée, on détermine le pourcentage d'animaux éprouvés par une crise convulsive, ainsi que le pourcentage de mortalité (établi en 24 heures).

Pour chaque substance étudiée, nous avons déterminé la DE 0 et la DE 100 :

1) concernant les crises

DE 0 = dose ne s'opposant à l'apparition des crises chez aucun sujet,

DE 100 = dose s'opposant à l'apparition des crises chez 100 % des sujets.

2) concernant la léthalité

DE 0 = dose n'assurant la survie d'aucun sujet,

DE 100 = dose assurant la survie de 100 % des sujets.

L'administration de doses intermédiaires, équidistantes selon l'échelle logarithmique à base 10, a permis d'établir la valeur de la DE 50 concernant les crises et concernant la léthalité.

B) Résultats Expérimentaux

Le tableau n° 13 présente les résultats que nous avons obtenus.

Le graphique n° 15 rend compte de la valeur de l'index chimiothérapeutique $\frac{DE\ 50}{D.I.L.}$, traduisant la protection contre les crises et la protection contre la léthalité.

Les substances qui ont manifesté une certaine activité dépressive centrale, exercent des effets protecteurs vis à vis du pentétrazol (la dichlorocyclohexanone géminée, et les trois dichlorocyclohexanols).

Les effets s'avèrent nets à la fois à l'égard de la léthalité et à l'égard des crises : l'activité protectrice s'exerce à faibles doses, et les DE 100 se montrent encore largement éloignées de l'infraléthale. Pour les trois alcools, l'ordre d'activité protectrice croissante, tant à l'égard des crises qu'à l'égard de la léthalité, s'établit ainsi :

Cis-Cis // Géminé / Cis-Trans

Le temps de latence qui précède l'apparition des crises n'est pas sensiblement allongé.

L'exitus survient un peu plus tardivement chez les sujets éprouvés que chez les sujets témoins, quelle que soit la dose administrée. Seuls les sujets éprouvés à des doses de dichlorocyclohexanol cis-cis supérieures à la DE 50 mortalité, succombent 45 minutes environ après l'administration du pentétrazol.

Généralement, la fréquence et l'intensité des

crises se montrent diminuées après l'administration des substances protectrices, excepté dans le cas du dichlorocyclohexanol cis-cis.

II - EFFETS PROTECTEURS VIS A VIS DE LA STRYCHNINE

A) Protocole Expérimental

Administrée par la voie intrapéritonéale, la dose de 0,002 g/kg de sulfate de strychnine mis en solution à 0,5 ‰ dans le soluté physiologique, détermine chez la Souris l'apparition d'une seule crise convulsive conduisant à la mort : 2 à 3 minutes après l'injection, une brève phase clonique éprouve l'animal ; la phase tonique succède rapidement, et la mort survient à courte échéance (3 à 7 minutes).

Sur 100 sujets témoins, répartis en lots de 5 mâles et 5 femelles, qui avaient reçu 0,20 ml d'H.O.N. 30 minutes avant l'administration du sulfate de strychnine, 95% ont été éprouvés par une crise convulsive et 93% ont succombé.

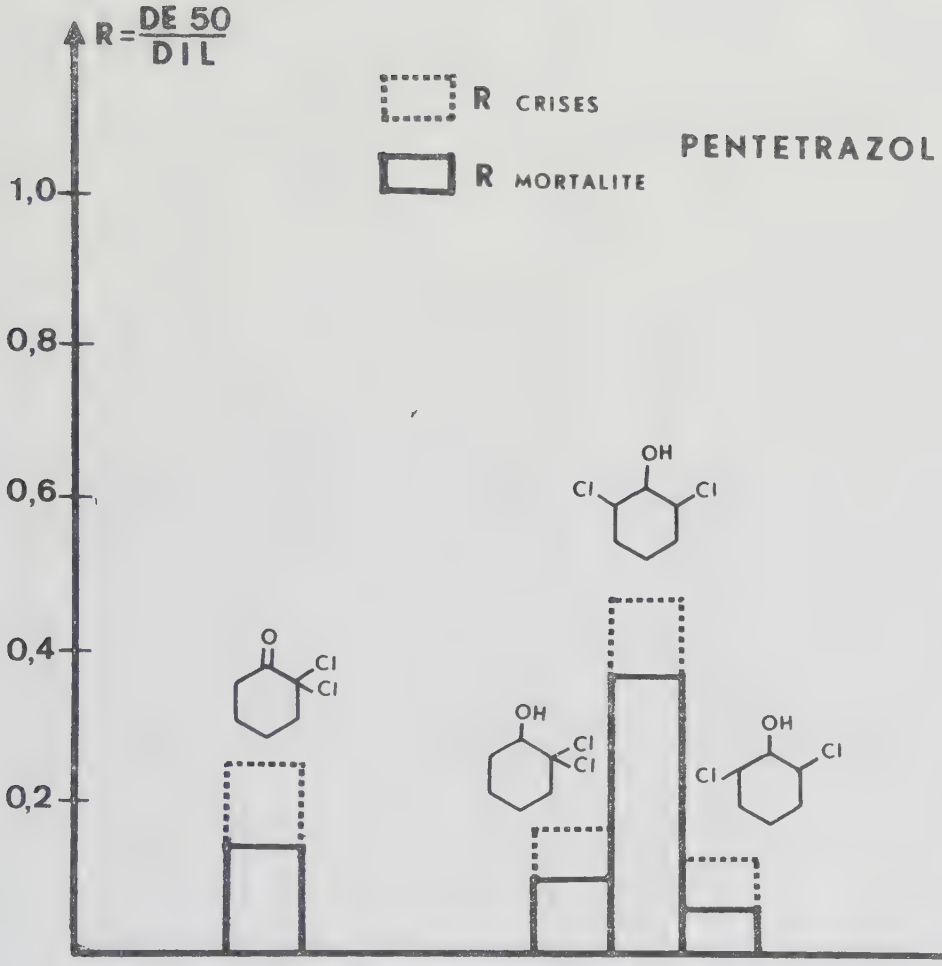
Les conditions expérimentales adoptées ont été les mêmes que celles qui ont été décrites plus haut pour l'épreuve au pentétrazol.

B) Résultats Expérimentaux

Les résultats que nous avons obtenus sont présentés dans le tableau n° 14 et le graphique n° 16.

Les dichlorocyclohexanones cis et trans et le dichlorocyclohexanol cis-cis n'assurent aucune protection contre les crises ni contre la léthalité due à la strychnine.

- La dichlorocyclohexanone géminée ne supprime l'apparition des crises strychniques que lorsqu'elle est administrée à des doses supérieures à l'infraléthale. Par contre elle assure, à des doses



GRAPHIQUE N° 15

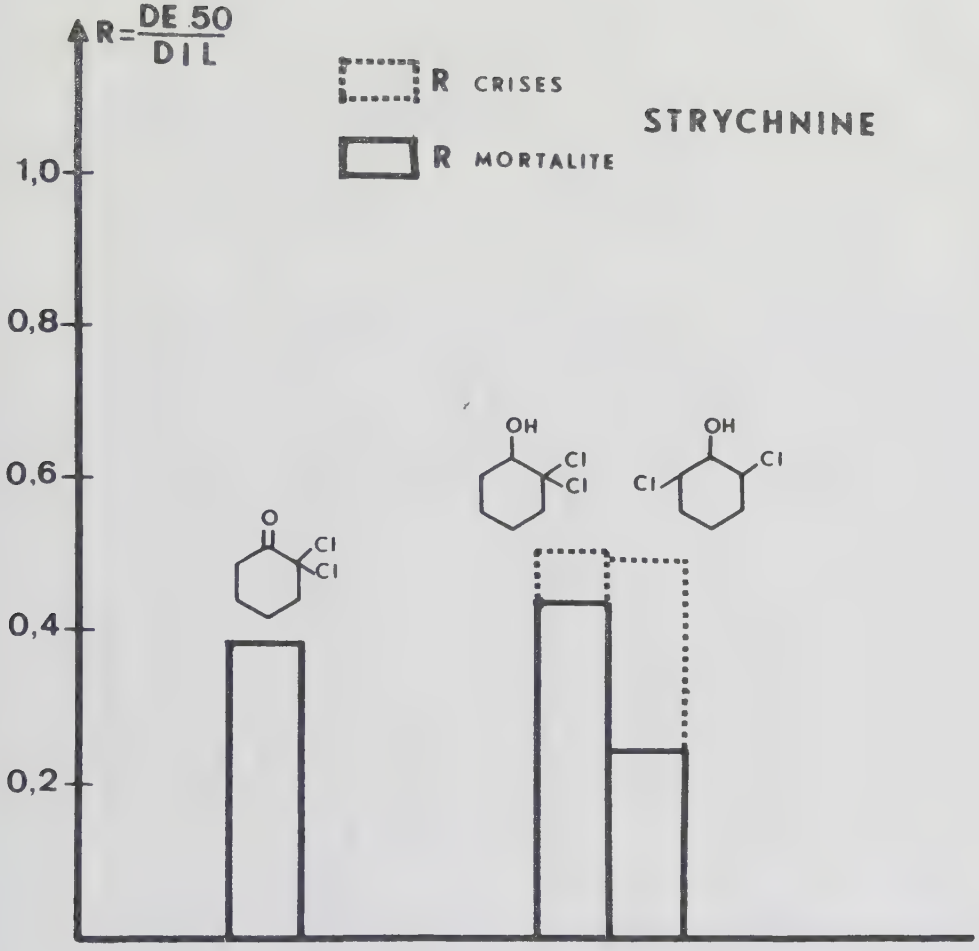
Effets anticonvulsivants de la dichlorocyclohexanone gémin
et des dichlorocyclohexanols géminé, cis-cis, et cis-trans
vis à vis du Pentétrazol.
(Souris voie I.P.)

TABLEAU N° 13

EFFETS PROTECTEURS CONTRE LES CRISES PENTETRAZOLIQUES

(Souris voie I.P. sol. 5% dans l'H.O.N.)

		Dichlorocyclo-hexanone	Dichlorocyclohexanols		
		GEMINEE	GEMINE	CIS-CIS	CIS-TRANS
CRISE	DE 0 g/kg	0,104	0,081	0,129	0,053
	DE 50 "	0,17(0,14-0,27)	0,13(0,11-0,14)	0,19(0,17-0,21)	0,093(0,079-0,107)
	DE 100 "	0,247	0,228	0,308	0,151
	$R = \frac{DE\ 50}{D.I.L.}$	0,24	0,16	0,46	0,11
	Latence moyenne (témoins 100 % de crises après 1 à 4 min.)	5 min.	5 min.	8 min.	4 min.
LETHALITE	DE 0 g/kg	0,073	0,043	0,083	0,035
	DE 50 "	0,10(0,06-0,13)	0,078(0,065-0,091)	0,157(0,138-0,180)	0,056(0,048-0,068)
	DE 100 "	0,247	0,100	0,248	0,100
	$R = \frac{DE.\ 50}{D.I.L.}$	0,14	0,1	0,36	0,07
	Survie moyenne (témoins 92 % de mortalité après 10 min).	24 min.	13 min.	23 min.	16 min.



GRAPHIQUE N° 16

Effets anticonvulsivants de la dichlorocyclohexanone géminée et des dichlorocyclohexanols géminé et cis-trans vis à vis de la Strychnine.
(Souris voie I.P.)

TABLEAU N° 14

EFFETS PROTECTEURS CONTRE LES CRISES STRYCHNIQUES

(Souris voie I.P. sol. 5 % H.O.N.)

		Dichlorocyclohexanone GEMINEE	Dichlorocyclohexanol GEMINE	Dichlorocyclohexanol CIS-TRANS
CRISE	DE 0 g/kg	0,35	0,282	0,353
	DE 50 "	-	0,412(0,36-0,46)	0,42(0,39-0.44)
	DE 100 "	Sup. à la D.I.L.	0,793	0,534
	$R = \frac{DE\ 50}{D.I.L.}$	-	0,51	0,5
	Latence moyenne (témoins : 95 % de crise après 2 à 3 min.)	4 min.	4 min.	4 min.
LETHALITE	DE 0 g/kg	0,175	0,281	0,100
	DE 50 "	0,27	0,35(0,32-0,38)	0,20(0,16-0,24)
	DE 100 "	0,53	0,52	0,43
	$R = \frac{DE\ 50}{D.I.L.}$	0,38	0,44	0,24
	Survie moyenne (témoins : 93 % de mortalité après 3 à 7 minutes)	26 min.	17 min.	30 min.

éloignées de l'infraléthale, la survie des sujets éprouvés à la strychnine.

Le temps de survie est augmenté de façon significative.

Les dichlorocyclohexanols cis-trans et géminé s'opposent à l'apparition des crises à des doses relativement élevées (DE 50 voisines de la moitié de l'infraléthale). Cependant des doses plus faibles de ces deux substances se montrent capables de modifier l'intensité de la crise strychnique : seule la phase clonique de la crise est observée, elle est même souvent réduite à quelques salves d'excitation motrice.

Vis à vis de la léthalité due à la strychnine, le dichlorocyclohexanol cis-trans se montre plus efficace que l'isomère géminé : son action se manifeste à des doses voisines du 1/8 de l'I.L. alors que l'alcool géminé ne commence à agir qu'à des doses voisines de la moitié de l'I.L.. De plus le dichloroalcool cis-trans retarde l'échéance mortelle, de façon plus nette que le dichloroalcool géminé.

III - CONCLUSIONS

Seuls la dichlorocyclohexanone géminée et les dichlorocyclohexanols cis-trans et géminé ont manifesté une action protectrice à la fois vis à vis du Cardiazol et vis à vis de la strychnine. Encore convient-il de formuler des réserves concernant les négligeables effets protecteurs exercés par la dichlorocyclohexanone géminée à l'égard des crises strychniques. DANYSK A. et al., 1970, ont montré que la 2.2 diallylcyclohexanone inhibe les convulsions induites par le pentétrazol mais reste sans effet vis à vis des crises strychniques.

Si l'on considère que l'excitation pentétrazolique a pour principale origine le cortex et les circuits thalamocorticaux, alors que le point de départ de

l'excitation strychnique est plus particulièrement médullaire, il est permis de conclure que la dichlorocyclohexanone géminée et le dichlorocyclohexanol cis-cis exercent une action dépressive à prédominance corticale, alors que les dichlorocyclohexanols cis-trans et géminé assurent une dépression à la fois corticale et médullaire.

CHAPITRE IV

EFFETS ANALGESIQUES CENTRAUX

Afin de compléter notre investigation des principaux effets d'origine centrale, il nous a semblé intéressant de rechercher un éventuel pouvoir analgésique.

Nous avons conduit notre étude chez la Souris qui constitue le réactif biologique engagé pour notre étude pharmacodynamique.

A) Protocole Expérimental

Nous avons retenu la méthode de HARDY D.J., WOLFF H.G., et GOODELL H. dont FRIEBEL H. et al., 1956, ont proposé une variante: le stimulus est un faisceau lumineux d'intensité constante (9 volts 4,5 ampères) focalisé sur la naissance de la queue de la Souris. L'animal supporte normalement cette épreuve pendant 3 à 4 secondes ; la réaction à la douleur se manifeste alors par un brusque mouvement de retrait de la queue. On évalue chronométriquement le temps de latence précédant la réaction à la douleur (= temps de réaction).

Les sujets éprouvés sont immobilisés dans des cylindres en matière plastique placés horizontalement ; la queue de l'animal sort par un orifice percé à l'extrémité du cylindre.

On constitue des lots homogènes de 5 mâles et 5 femelles pesant de 22 à 25 g et l'on détermine la valeur initiale du temps de réaction, qui est la moyenne de 3 mesures effectuées à 5 minutes d'intervalle.

On effectue de nouvelles mesures 15, 30, 45, 60, 90 et 120 minutes après l'administration du produit

par la voie intrapéritonéale ; celui-ci est mis en solution à 5 % dans l'H.O.N.

Le critère de l'analgésie retenu est l'augmentation du temps de réaction jusqu'à obtention d'une valeur égale à une fois et demie la valeur initiale.

L'épreuve n'est pas poursuivie au-delà de 8 secondes afin d'éviter la brûlure de la queue de l'animal éprouvé. Pour chaque dose administrée, nous avons suivi les variations du pourcentage de sujets analgésiés en fonction du temps.

Après avoir déterminé les doses limites de l'activité analgésique (DE 0, DE 100, doses susceptibles de provoquer l'analgésie respectivement chez 0 % et 100 % des sujets éprouvés), nous avons administré des doses intermédiaires équidistantes suivant l'échelle logarithmique à base 10. La valeur de la DE 50 a été établie aux échéances de 30 et 60 minutes, en suivant la méthode exposée p. 23.

B) Résultats Expérimentaux

Les dichlorocyclohexanones cis et trans ne manifestent aucun effet analgésique lorsqu'elles sont administrées à des doses infraléthales. Les doses léthales ne déterminent qu'une discrète activité.

L'activité de la dichlorocyclohexanone géminée et celle des trois dichlorocyclohexanols se montre plus nette, bien qu'au demeurant peu notable, comme en témoigne le tableau présenté page suivante.

Produit étudié	DE 50 g/kg		$R = \frac{DE\ 50}{DIL}$	
	30 min.	60 min.	30 min.	60 min.
Dichlorocyclohexanone Géminée	0,68	0,70	0,97	1
Dichlorocyclohexanol Géminé	0,70	0,70	0,88	0,88
Dichlorocyclohexanol Cis-Cis	0,29	0,34	0,70	0,82
Dichlorocyclohexanol Cis-Trans	0,56	0,58	0,68	0,71

Les effets analgésiques s'avèrent de courte durée avec la dichlorocyclohexanone géminée (moins de 2 heures), un peu plus durable avec le dichlorocyclohexanol géminé (2 heures).

L'activité des dichlorocyclohexanols cis-cis et cis-trans persiste respectivement 90 minutes et 2 heures après l'administration de ces produits.

CONCLUSIONS

L'étude pharmacodynamique des trois dichlorocyclohexanones et des trois dichlorocyclohexanols amène les remarques suivantes.

- Les dichlorocyclohexanones cis et trans administrées à la D.I.L. abaissent la température centrale ; leur action pharmacodynamique se limite à cet effet, les autres tests engagés se sont révélés négatifs.

- Les substances dont nous avons étudié les effets pharmacodynamiques ; dichlorocyclohexanone géminée et les trois dichloroalcools isomères, se sont montrées diversement actives.

Il est intéressant de noter que les effets hypothermisants peuvent être dissociés des autres effets centraux : effets hypnotiques et potentialisateurs de l'hexobarbital, action renforçatrice des agents convulsivants. Le dichlorocyclohexanol géminé ne présente, aux doses inférieures à l'infraléthale, qu'un très léger pouvoir hypothermisant, mais il manifeste à ces mêmes doses une action hypnotique nette ainsi que des effets potentialisateurs marqués vis à vis de l'hexobarbital.

Les propriétés pharmacodynamiques de ces dérivés du cyclohexane semblent d'une part, relever d'un mécanisme physico-chimique non spécifique(pénétration de ces substances dans les lipides du SNC) d'autre part, d'une action sur le métabolisme hépatique, dans le cas de la potentialisation de l'hexobarbital (BURNS J. J. et al., 1965).

La différence de l'action pharmacodynamique observée entre les isomères cis-cis et cis-trans des dichlorocyclohexanols pose le problème de l'activité des couples de stéréoisomères. la grande diversité des couples cis/trans ne permet pas de formuler une règle générale dans ce domaine.

CAUJOLLE F. et MEYNIER D., 1958 et 1959 ont montré la la moindre toxicité des isomères Trans dans le cas de l'anéthole et de l'isoeugenol. La nette activité pharmacodynamique des isomères Trans s'est manifestée dans le cas de dérivés complexes du cyclohexane (KAY J. B. et al., 1969, LIPPMANN W., 1970, VOLLMER K. O. and POISSON A., 1970) ainsi que dans d'autres séries chimiques (BLOHM T. R., 1970).

QUATRIEME PARTIE

ETUDE DU METABOLISME DES DICHLOROCYCLOHEXANONES ET DICHLOROCYCLOHEXANOLS ISOMERES

CONSIDERATIONS PRELIMINAIRES

Les données essentielles concernant les processus de détoxication engagés par l'animal après administration de dérivés cyclohexaniques ont été résumées par CAHUZAC A.M., 1970.

Les résultats acquis dans notre Laboratoire avec les dérivés monochlorés nous ont incitée à prévoir :

- la réduction de la fonction cétone,
- l'hydroxydéchloration,
- la conjugaison des dérivés hydroxylés,
- la N. acétylcysteyldéchloration (formation d'acide mercapturique).

Nous avons examiné les urines, la bile et les fèces des animaux éprouvés à dose non mortelle des substances étudiées.

CHAPITRE I

ETUDE DE L'ELIMINATION URINAIRE

I - DONNEES BIOLOGIQUES

A) Choix des Animaux

Nous avons choisi pour notre étude le Rat adulte (Rattus norvegicus var. Albinos, souche Wistar A.G.). Cet animal constitue un matériel de choix pour l'étude du métabolisme, car il permet une exploration biologique aisée.

Seuls les sujets mâles ont été retenus afin d'éviter l'interférence cyclique des oestrogènes phénoliques.

Les animaux pesaient de 250 à 350 g.

B) Conditions expérimentales

La nette agressivité de la voie I.P. dans le cas des cétones cis et trans, ne nous a pas permis de retenir cette voie. Nous avons donc administré par la voie entérale, à des lots de 10 Rats mâles, une dose équimoléculaire de chaque substance : cette dose de 1 m Mole/Kg demeure toujours inférieure à l'infraléthale quelle que soit la substance administrée, ainsi qu'en témoigne les valeurs du rapport $\frac{\text{Dose administrée}}{\text{D.I.L.}}$ réunies ci-après

Produit administré	Dose administrée / DIL
Dichlorocyclohexanone Géminée	0,13
Dichlorocyclohexanone Cis*	0,76
Dichlorocyclohexanone Trans	0,57
Dichlorocyclohexanol Géminé	0,22
Dichlorocyclohexanol Cis-Cis	0,18
Dichlorocyclohexanol Cis-Trans	0,13

Les produits ont été mis en solution dans l'H.O.N. (solution à 10 %).

10 sujets témoins ont reçu par la même voie un volume de véhicule seul correspondant au volume moyen de solution administré aux animaux éprouvés (0,50 ml).

Après l'épreuve, les animaux sont introduits par groupe de deux dans des cages à métabolisme cylindriques de 21 × 23 cm de diamètre, spécialement conçues pour la collecte des urines. Ils disposent d'eau à volonté.

La collecte des urines a été conduite pendant les 36 heures qui ont suivi l'administration de chaque substance étudiée : les 12 premières heures, on a réuni toutes les 2 heures les volumes d'urine émis par l'ensemble des animaux éprouvés à une même substance.

Après avoir déterminé les caractères organoleptiques de chaque échantillon ainsi constitué,

on en a évalué le volume, et estimé le pH dont la valeur se situe normalement entre 6,2 et 6,4.

Nous adopterons l'abréviation "Te" et "Tr" pour qualifier respectivement les urines émises par les sujets témoins et les urines émises par les sujets éprouvés à la substance étudiée (traités).

II - DONNEES BIOCHIMIQUES

A) Dosage des formes glucuro-et sulfoconjuguées

1.-Dosage des glucuroconjugués

Principe

En milieu acide minéral fort, les acides hexuroniques se condensent avec le naphtorésorcinol et conduisent à la précipitation d'un complexe de coloration violette, extractible par divers solvants organiques.

Dérivant de cette réaction, plusieurs protocoles expérimentaux ont été proposés. Les divergences observées intéressent les modalités d'extraction du pigment.

La technique de JAYLE M.F. et al., 1961, qui prévoit l'extraction par l'éther éthylique a été retenue.

Réactifs

• Solution standard d'acide glucuronique à 10 mg%ml (soit 9,07 mg de glucurone). Conservée à + 4°C, cette solution se montre stable pendant 3 semaines.

• Solution de napthorésorcine à 0,6 g% dans l'eau distillée, préparée et "mûrie" extemporanément au bain-marie bouillant pendant 15 minutes, puis immédiatement refroidie dans un bain-marie froid.

• Solution d'acide sulfurique

$H_2 SO_4$ pur d = 1,84	1 partie
eau distillée	3 parties

• Ether éthylique (exempt de peroxydes).

Mode opératoire

Des essais préliminaires nous ont permis de déterminer les dilutions aqueuses devant affecter les échantillons urinaires : les urines "Tr" ont été diluées au 1/100e, les urines "Te" ont été diluées au 1/50e.

Dans de telles conditions, la quantité d'acide glucuronique contenue dans la prise d'essai était inférieure à 30 γ.

Pour chaque série de dosages, on établit une gamme d'étalonnage mettant en jeu de 0 à 30 γ d'acide glucuronique.

Dans chaque tube à essai on introduit : 0,5 ml de dilution, on ajoute 0,5 ml de solution de naphtorésorcine et 1 ml d'acide sulfurique ; les tubes sont bouchés avec du coton cardé et sont portés 30 minutes au bain-marie bouillant. Après refroidissement sous courant d'eau froide et addition de 5 ml d'éther, ils sont soumis à une agitation énergique.

Les lectures de la phase éthérée se font au spectrophotomètre à 570 mμ par rapport à un blanc, correspondant au tube de la gamme étalon dans lequel on n'a pas introduit d'acide glucuronique.

2.-Dosage des sulfoconjugués

Le principe de la méthode repose sur le dosage des sulfates urinaires avant hydrolyse (sulfate minéral) et après hydrolyse (sulfates totaux = sulfate organique + sulfate minéral). Le taux de

sulfoconjugués correspond à la différence existant entre le deuxième et le premier essai. Les conditions expérimentales de l'hydrolyse ont été empruntées à NATELSON S., 1961.

La détermination des sulfates a été faite en suivant la microtechnique d'AUVERGNAT R. et al., 1966. Cette technique repose sur la précipitation de l'anion SO_4^{2-} sous forme de sel de baryum, au sein d'une solution de Dextran, polysaccharide macromoléculaire, qui permet de maintenir le précipité en suspension, pendant un temps suffisamment long pour pouvoir réaliser la mesure de la densité optique.

B) Identification des métabolites urinaires, libres ou libérés par hydrolyse des formes conjuguées.

1.-Technique générale d'extraction

Nous avons établi un protocole général d'extraction qui autorise l'extraction :

- des substances administrées, éliminées inchangées,
- des métabolites libres,
- des métabolites conjugués.

Nous nous sommes inspirée de la technique que JAYLE M.F. et al., 1961, ont décrite pour la séparation des stéroïdes hormonaux (méthode de BURSTEIN et LIEBERMAN).

Les conditions opératoires que nous avons adoptées sont les suivantes :

10 ml d'urine sont saturés par 20 % de chlorure de sodium et amenés à pH 1 par addition de $H_2 SO_4$ à 10 %.

On extrait 3 fois par 1 volume d'acétate d'éthyle, en agitant énergiquement. Après centrifugation, la phase organique est prélevée et filtrée sur du sulfate de sodium anhydre permettant la deshydratation de cette phase.

Les trois extraits sont réunis et évaporés sous pression réduite à 30°C au "Rotavapor".

L'extrait pour chromatographie est obtenu à partir du résidu sec d'évaporation que l'on agite avec 20 ml de sulfure de carbone. La phase organique est prélevée puis évaporée à sec dans les mêmes conditions. Le résidu est repris par 1 ml d'acétate d'éthyle. Les extraits obtenus sont par conséquent concentrés 10 fois par rapport au volume initial.

Cette opération extractive a été conduite sur :

- des urines avant toute hydrolyse,
- l'hydrolysat obtenu par hydrolyse acide ou hydrolyse enzymatique de l'urine,
- la solution obtenue après un entraînement à la vapeur d'eau.

Nous avons opéré simultanément sur 10 ml d'urine "Tr" et sur un volume égal d'urine "Te".

Les urines "Tr" et "Te" conduisent respectivement aux extraits que nous désignerons par les abréviations "Tr" et "Te".

2.-Techniques d'hydrolyse

L'hydrolyse acide

Réalisée par l'acide chlorhydrique, cette hydrolyse intéresse la glucuro-et la sulfoconjugaison.

Les conditions opératoires adoptées ont été les suivantes : à 10 ml d'urine on ajoute 2 ml d'HCl pur (d = 1,18) et l'on porte à ébulltion sous réfrigérant à reflux pendant 30 minutes. Sur l'hydolysat refroidi on procède à l'extraction par

l'acétate d'éthyle, décrite précédemment.

L'hydrolyse enzymatique

Réalisée par la β glucuronidase bactérienne, cette hydrolyse se montre spécifique des composés intéressés par la liaison β glucosiduronique : à 10 ml d'urine ajustés à pH 6,2, on ajoute 10 ml de solution tampon phosphate 0,2 M (Methods in Enzymology, tome I, p. 143) dans lesquels on a dissout 10.000 unités FISHMAN de β glucuronidase bactérienne ; on laisse incuber 24 heures à 37°C en s'assurant régulièrement que le pH ne subit aucune variation.

La technique générale d'extraction précédemment décrite permet ensuite d'obtenir à partir de l'hydrolysat un extrait pour chromatographie.

3.-Technique de séparation par adsorption sur gel de silice.

Cette technique d'extraction a été instaurée afin de mettre en évidence de très faibles quantités de cyclohexanediol 1-2. Elle présente d'autre part l'avantage d'assurer l'élimination de pigments urinaires susceptibles de perturber l'interprétation des chromatogrammes.

Après passage sur gel de silice, les pigments urinaires restent fixés sur l'adsorbant et les cyclohexanediols 1-2 cis et trans sont séparés sélectivement de l'extrait urinaire.

Des essais préliminaires ont consisté à déposer à la tête d'une colonne (10 cm) de silice (30-70 mesh A.T.S.M. Merck) imprégnée d'acétate d'éthyle, 2 ml d'un extrait urinaire "Te" obtenu après hydrolyse acide et chargé d'une quantité connue de cyclohexanediol 1-2 cis et trans.

Après élution par 80 ml d'acétate d'éthyle, les éluats recueillis par fraction de 10 ml, sont évaporés sous pression réduite ; les résidus d'évaporation,

repris par 0,1 ml d'acétate d'éthyle conduisent à un extrait incolore qui est examiné par chromatographie sur couches minces, dans les systèmes de solvant c et d.

Dans les fractions 4 à 7, les cyclohexanediol 1-2 cis et trans sont mis en évidence à l'exclusion de toute autre substance.

Le même protocole expérimental est reproduit sur l'extrait urinaire obtenu après l'hydrolyse acide réalisée sur 30 ml d'urine "Tr".

4.-Technique d'entraînement à la vapeur d'eau

Afin de satisfaire aux exigences déterminées par la séparation chromatographique en phase vapeur, nous avons eu recours à la technique d'entraînement à la vapeur d'eau qui permet d'atteindre une séparation plus sélective des métabolites :

10 ml d'urine, ou l'hydrolysat acide obtenu à partir de 10 ml d'urine selon la technique précédemment décrite, sont soumis à un entraînement à la vapeur d'eau. On recueille 30 ml de distillat sur lequel on procède à l'extraction par l'acétate d'éthyle décrite plus haut, qui conduit à un extrait concentré 10 fois par rapport à l'urine initiale. Cet extrait est examiné en chromatographie en phase vapeur.

5.-Technique de chromatographie sur couches minces

Nous avons suivi la technique de chromatographie ascendante bidimensionnelle selon RANDERATH K., 1964.

α) Le support, réalisé à l'aide du système DESAGA, est constitué par une couche de gel de silice (gel H. MERCK) de 250 μ d'épaisseur. Les plaques sont activées par passage de 30 minutes à l'étuve portée à 110°C et conservées en atmosphère sèche.

β) Les substances de références

Nous nous sommes attachée à réaliser la mise en évidence et la séparation des substances suivantes :

- Dichlorocyclohexanones cis, trans, géminée.
- Dichlorocyclohexanols cis-cis, cis-trans, géminé, trans-trans, (échantillons ayant servi à l'épreuve des animaux).
- Cyclohexanone (FLUKA) redistillée au Laboratoire.
- Chloro-2-cyclohexanone (FLUKA) : après recristallisation dans l'éther de pétrole, F = 24°C n_D^{20} = 1,4838.
- Chloro-2-cyclohexanol cis : préparé dans notre Laboratoire : F = 27-28°C n_D^{20} = 1,4891.
- Chloro-2-cyclohexanol trans (FLUKA) : après recristallisation dans l'éther de pétrole F = 27-29°C n_D^{20} = 1,4853.
- Cyclohexanediol 1-2 (PROLABO). Les isomères cis et trans, séparés dans notre Laboratoire :

  Cis : F = 94 -96°C.
  Trans : F = 102 -103°C.

- Chloro-2-cyclohexène-2-3-one-1 préparé dans notre Laboratoire F = 72°C.
- Phénol (PROLABO) redistillé.

Nous avons réalisé des solutions à 0,2 % (P/V) dans l'acétate d'éthyle.

γ) Les systèmes de solvants

Nous avons retenu deux systèmes de solvants :

SYSTEME I : à bonne résolution pour la cyclohexanone, chloro-2-cyclohexanone, chloro-2-cyclohexanols cis et trans, les dichlorocyclohexanones, les dichlorocyclohexanols, la chloro-2-cyclohexène-2-3-one-1, le phénol.

a Benzène / Chloroforme (1 % Ethanol) (5-5)

b Benzène / Ether éthylique (6-4)

SYSTEME II : à bonne résolution pour les cyclohexanediols 1-2 cis et trans.

c Chloroforme (1 % Ethanol) / Acétate d'éthyle / Acide acétique (5-3-2)

d Benzène / Acétate d'éthyle / Acide acétique (6-2-2).

δ) Les réactifs de détection

Deux révélateurs ont été retenus :

• L'aldéhyde p. anisique utilisé par STAHL E. et al., 1965, pour obtenir la séparation des stéréoisomères du menthol.

La composition de ce réactif est la suivante :

Aldéhyde p. anisique	0,5	ml
Acide acétique	10	ml
Alcool méthylique R.P.	85	ml
Acide sulfurique (d = 1,84)	5	ml

On pulvérise sur la plaque 10 ml du mélange fraîchement préparé. La coloration se développe après passage de 15 minutes à l'étuve à 100-120°C. Ce réactif ainsi utilisé conduit à différentes colorations :

• Cyclohexanediol 1-2 cis	Rose
• Cyclohexanediol 1-2 trans	Bleu foncé
• Cyclohexanone	Rouge
• Chloro-2-cyclohexanone	Rouge
• Chloro-2-cyclohexanol cis	Rose
• Chloro-2-cyclohexanol trans	Bleu foncé
• Phénol	Rose

Les dichlorocyclohexanones, les dichlorocyclohexanols et la chloro-2-cyclohexène-2-3-one-1 ne sont pas révélés par ce réactif.

Nous avons eu recours au réactif à la dibromo-2-6-quinone chloroimide utilisé par STAHL E. et al., 1965, pour la mise en évidence des phénols et de la vitamine B_6.

La composition et les conditions d'utilisation du réactif sont les suivantes : dans un premier temps, on pulvérise la plaque avec de la soude 0,1 N puis on applique un spray d'une solution de dibromo-2-6-quinone chloroimide à 0,5 % dans l'éthanol préparée extemporanément et l'on chauffe la plaque à 130°C pendans 10 minutes.

Avec les dichlorocyclohexanones et les dichloroçyclohexanols des taches brunes apparaissent sur un fond très légèrement coloré. Le phénol donne lieu à une coloration bleu lilas et la chloro-2-cyclohexène-2-3-one-1 à une coloration bleu vert.

Les deux réactifs retenus permettent la mise en évidence de quantités de chaque substance de l'ordre de 2 à 3 µg.

Nous avons reporté dans le tableau n° 15 la valeur des Rf correspondant aux substances mises en évidence.

6.-Technique de chromatographie en phase vapeur

Nous avons utilisé un appareil BARBER-COLMAN 5000 à double colonne et à double détecteur à ionisation de flamme, muni d'une colonne de 6' 1/4" garnie de 3 % de SE. 30 sur Anakrom A.B.S. (100/110 mesh) à la température de 110°C. La température de l'injecteur était de 150°C et celle du détecteur de 240°C. Le débit du gaz vecteur (N_2) était de 60 ml/min.

Mais cette colonne n'a pas permis la séparation des cyclohexanediols 1-2 cis et trans, et nous avons été

amenée à utiliser une seconde colonne dont voici les caractéristiques : colonne de 2'1/4" garnie de 0,5 % de Carbowax 20 M sur billes de verre (60/80 mesh) à la température de 113°C. Les températures de l'injecteur et du détecteur étaient identiques à celles de la colonne précédente ainsi que la vitesse du gaz vecteur.

Les temps de rétention, en minutes, ont été reportés dans le tableau n° 16.

Une quantité connue de chaque substance de référence a été ajoutée à 10 ml d'urine témoin et cet échantillon d'urine a été soumis aux conditions opératoires que nous venons de décrire (hydrolyse, extraction, chromatographie sur couche mince, chromatographie en phase vapeur). Cet essai nous a permis de mettre en évidence un artefact d'hydrolyse acide, dans le cas de l'épreuve aux dichlorocyclohexanone et dichlorocyclohexanol géminés. Les autres substances de référence n'ont subi aucune altération au cours des différentes opérations engagées.

C) Recherche des acides mercapturiques

Nous avons repris la technique de chromatographie descendante, décrite par CAHUZAC A.M. 1970 et réalisée sur papier WHATMAN n°1. Pour les trois systèmes de solvants engagés le temps de migration était de 16 heures.

Les systèmes de solvants étaient :

SYSTEME III	n-Butanol	10
	Ethanol	10
	Ammoniaque	1
	Eau	4
SYSTEME IV	n-Butanol	8
	Ammoniaque 2N	12

(migration dans la phase supérieure)

TABLEAU N° 15

CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHES MINCES

Valeur des Rf des substances de Références

Systèmes de solvants :

a = Benzène / Chloroforme (0,5 % éthanol) 5-5

b = Benzène / Ether éthylique 6-4

c = Benzène / Acétate d'éthyle / Acide acétique 6-2-2

d = Chloroforme (0,5 % éthanol) / Acétate d'éthyle / Acide acétique 5-3-2.

Substances de références	Systèmes			
	a	b	c	d
Dichlorocyclohexanol Géminé	0,28	0,62		
Dichlorocyclohexanol Cis-Cis	0,46	0,79		
Dichlorocyclohexanol Cis-Trans	0,31	0,66		
Dichlorocyclohexanol Trans-Trans	0,40	0,71		
Dichlorocyclohexanone Géminée	0,67	0,73		
Dichlorocyclohexanone Cis	0,38	0,67		
Dichlorocyclohexanone Trans	0,53	0,67		
Chloro-2-Cyclohexanol Cis	0,20	0,55	1,0	0,8
Chloro-2-Cyclohexanol Trans	0,16	0,53	1,0	0,8
Cyclohexanediol 1-2 Cis	-	-	0,48	0,44
Cyclohexanediol 1-2 Trans	-	-	0,43	0,40
Phénol	0,22	0,69		
Chloro-2-cyclohexene-2-3-one-1	0,40	0,64		
Cyclohexanone	0,30	0,63		

TABLEAU N° 16

CHROMATOGRAPHIE EN PHASE VAPEUR

Temps de rétention en minutes

Métabolites	SE. 30 3 % t° = 110° C	Carbowax 20 M 0,5 % t° = 113°C
Dichlorocyclohexanol Géminé	3,6	2,2
Dichlorocyclohexanol Cis-Cis	6,5	10,5
Dichlorocyclohexanol Cis-Trans	4,8	5,7
Chloro-2-Cyclohexanol Cis	2,2	0,9
Cyclohexanediol 1-2 Cis	-	4,2
Cyclohexanediol 1-2 Trans	-	5,4
X	2,3	0,9
X'	2,2	0,9

SYSTEME	V	n-Butanol	24
		Eau	12
		Acide acétique	5
		Acétate de butyle	2

Deux révélateurs ont été utilisés :

1°) Le réactif de KNIGHT R.H. et YOUNG L.,1958.

- Spray 1 = solution de bichromate de potassium 0,1 M + acide acétique R.P. (aa)

- Spray 2 = solution de nitrate d'argent 0,1 M ; ce réactif est spécifique des composés à groupement thiol.

2°) La ninhydrine, en solution à 0,1 % dans le n-butanol saturé d'eau, confère une coloration violette aux acides aminés. Si les acides mercapturiques ne sont pas révélés, par contre les dérivés de la cystéine substituée sur le soufre sont révélés par ce réactif.

Les urines à pH 6,2 et les urines à pH 1, ont été examinées à l'aide de cette technique.

III - RESULTATS EXPERIMENTAUX

A) Formes conjuguées urinaires

α) Glucuroconjugués totaux

Le graphique n° 17 rend compte de l'élimination d'acide glucuronique évaluée pour un sujet pendant chaque intervalle de 12 heures jusqu'à la 36ème heure qui suit l'administration de la substance étudiée ; comparativement a été évaluée pour un sujet témoin l'élimination correspondant aux mêmes intervalles de temps.

Le maximum d'élimination se situe entre la première et la 6ème heure pour la dichlorocétone géminée, entre la première et la 12ème heure pour les dichloroalcools géminé et cis-trans, entre la 12ème et la 24ème heure pour les dichlorocétones cis et trans et le dichloroalcool cis-cis.

Le taux d'acide glucuronique a repris sa valeur normale après 12 heures pour la dichlorocétone géminée, après 24 heures pour les dichloroalcools géminé et cis-trans. Pour les dichlorocétones cis et trans et pour le dichloroalcool cis-cis l'élimination glucuronique n'est totalement terminée qu'après la 36ème heure.

Il est permis de rapprocher ces résultats des valeurs du temps de crise qui ont été établies chez le Rat :

- pour la dichlorocyclohexanone et le dichlorocyclohexanol géminé, le temps de crise est de 24 heures ; à cette même échéance l'élimination de ces substances sous forme glucuroconjuguée est achevée.

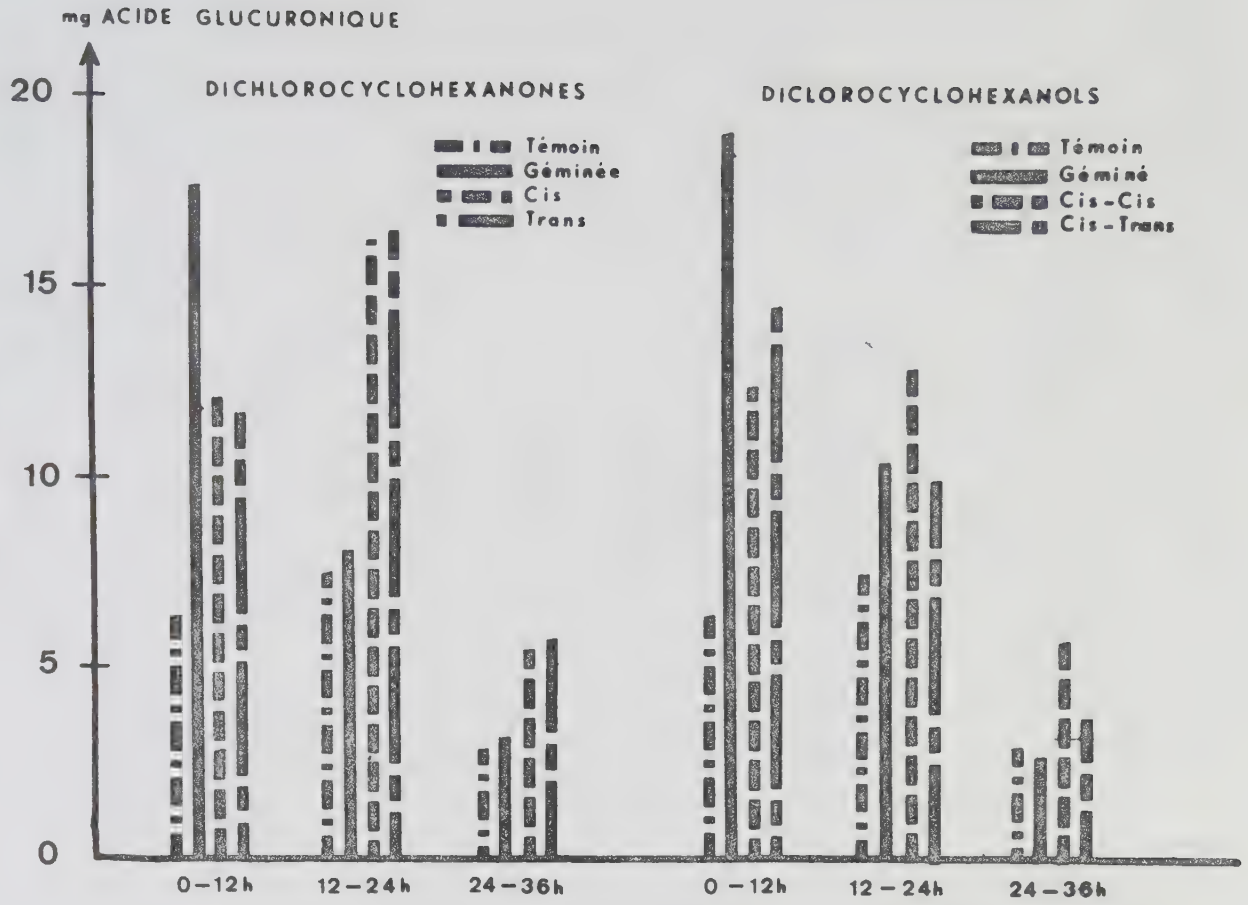
- le temps de crise est de 4 jours pour la dichlorocyclohexanone trans, de 24 heures pour le dichloroalcool cis-trans ; l'élimination sous forme glucuroconjuguée se réalise plus tardivement pour la cétone que pour l'alcool.

- le temps de crise est de 2 jours pour la dichlorocétone cis, et de 24 heures pour le dichloroalcool cis-cis ; dans le cas particulier concerné, l'élimination de l'alcool sous forme glucuroconjuguée est encore importante au temps de crise. Passé ce délai, le dichloroalcool cis-cis reste donc présent dans l'organisme en quantité notable, et ce fait peut être mis en parallèle avec les observations réalisées au niveau tissulaire.

β) Sulfoconjugués totaux

Les résultats atteints n'ont fait apparaître aucune différence significative dans l'élimination des sulfoconjugués par les sujets éprouvés et par les sujets témoins.

Le processus de sulfoconjugaison n'intervient donc pas dans le métabolisme des substances envisagées.



GRAPHIQUE N° 17

Dosage des glucuroconjugués

B) Identification des métabolites urinaires libres ou glucuroconjugués

α) Par chromatographie sur couches minces

Les graphiques n° 18 à 23 illustrent les résultats acquis. Les tableaux n° 17 et 18 permettent une confrontation métabolique au niveau biliaire, fécal et urinaire.

1/ Avant toute hydrolyse

Dichlorocyclohexanones

Dans les extraits "Tr" réalisés avant toute hydrolyse, nous avons pu observer dans le cas des trois dichlorocétones :

1. l'absence de la substance administrée.

2. la présence peu notable de 2 spots qui correspondent aux cyclohexanediols 1-2 cis et trans. Ces deux substances se trouvent donc en faible quantité à l'état libre dans l'urine.

3. la présence d'un spot identifié à l'alcool dichloré provenant de la réduction de la dichlorocétone, c'est-à-dire :

Dichlorocyclohexanone géminée $\xrightarrow{\text{Red.}}$ Dichlorocyclohexanol géminé

Dichlorocyclohexanone cis $\xrightarrow{\text{Red.}}$ Dichlorocyclohexanol cis-cis

Dichlorocyclohexanone trans $\xrightarrow{\text{Red.}}$ Dichlorocyclohexanol cis-trans.

Il convient de noter que le dichloroalcool n'est présent à l'état libre qu'en très faible quantité.

Dichlorocyclohexanols

La chromatographie sur couches minces a mis en évidence avant toute hydrolyse :

1. la présence dans les trois cas envisagés, de faibles quantités du produit administré, non métabolisé.

2. la présence en faible quantité de cyclohexanediol 1-2 cis et trans uniquement après épreuve aux dichlorocyclohexanols cis-cis et cis-trans.

2/ Après hydrolyse

a) Hydrolyse enzymatique

• L'action de la β glucuronidase a conduit à la mise en évidence des copules suivantes :

1. après épreuve à la dichlorocyclohexanone géminée et au dichlorocyclohexanol géminé, on retrouve le dichlorocyclohexanol géminé et une substance X qui présente dans chacun des systèmes de solvants adoptés un Rf différent de celui des divers métabolites présumés : solvant a : Rf = 0,18, solvant b : Rf = 0,13.

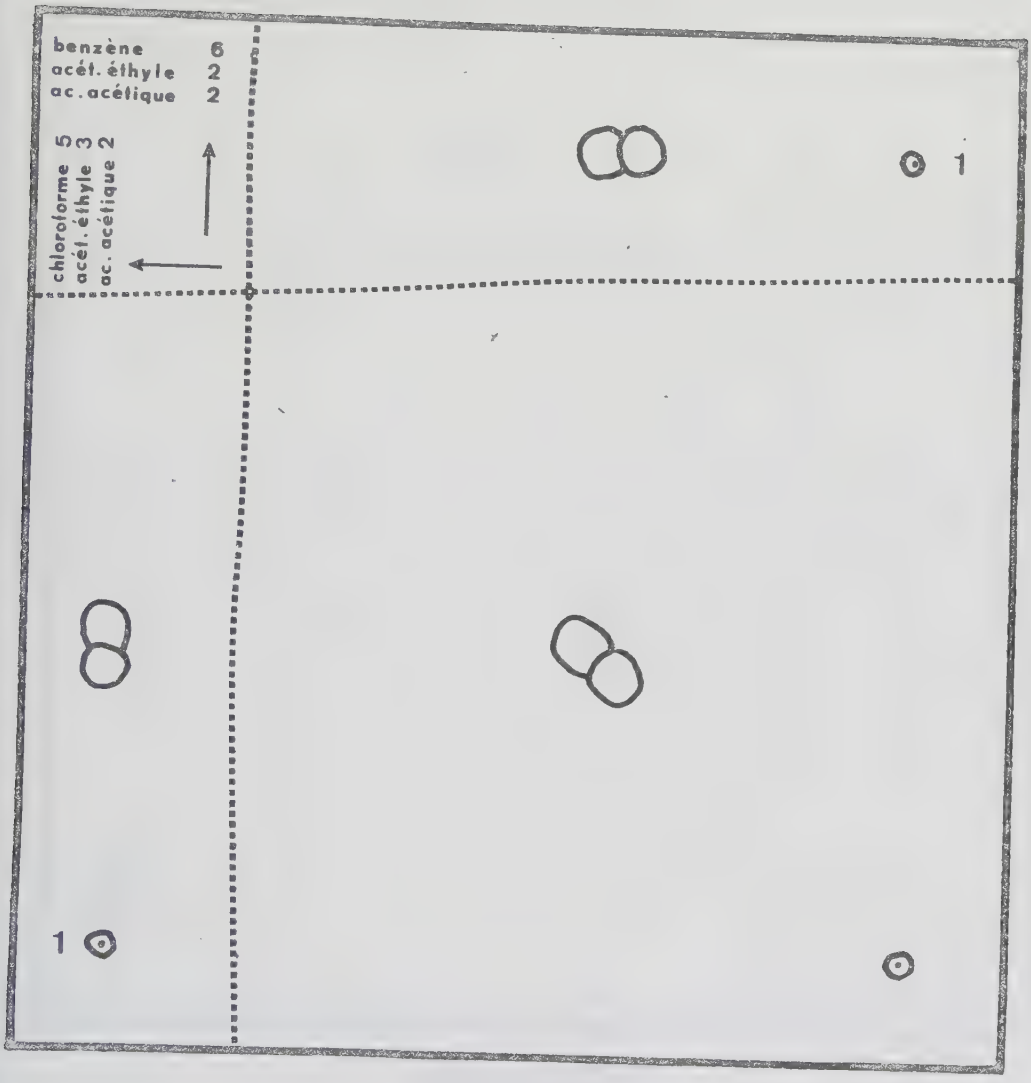
2. après épreuve à la dichlorocyclohexanone trans et au dichlorocyclohexanol cis-trans, il s'élimine le dichlorocyclohexanol cis-trans. Une substance X', présente en très faible quantité est retrouvée uniquement après épreuve à la cétone trans. Cette substance présente un comportement chromatographique identique à celui du chloro-2-cyclohexanol cis (CAUJOLLE et al., 1970).

3. après épreuve à la dichlorocyclohexanone cis et au dichlorocyclohexanol cis-cis, on retrouve le dichlorocyclohexanol cis-cis et en quantité moins importante, le dichlorocyclohexanol cis-trans.

Le cyclohexanediol 1-2, déjà mis en évidence dans les urines à l'état libre, se montre lui aussi intéressé par la liaison β glucosiduronique ; toutefois après épreuve au dichlorocyclohexanol géminé, l'hydrolyse enzymatique n'a permis la mise en évidence d'aucun des deux isomères.

b) Hydrolyse acide

Ce mode d'hydrolyse moins spécifique mais plus drastique que l'hydrolyse enzymatique conduit à des résultats identiques à ceux qui ont été atteints après action de la β glucuronidase.

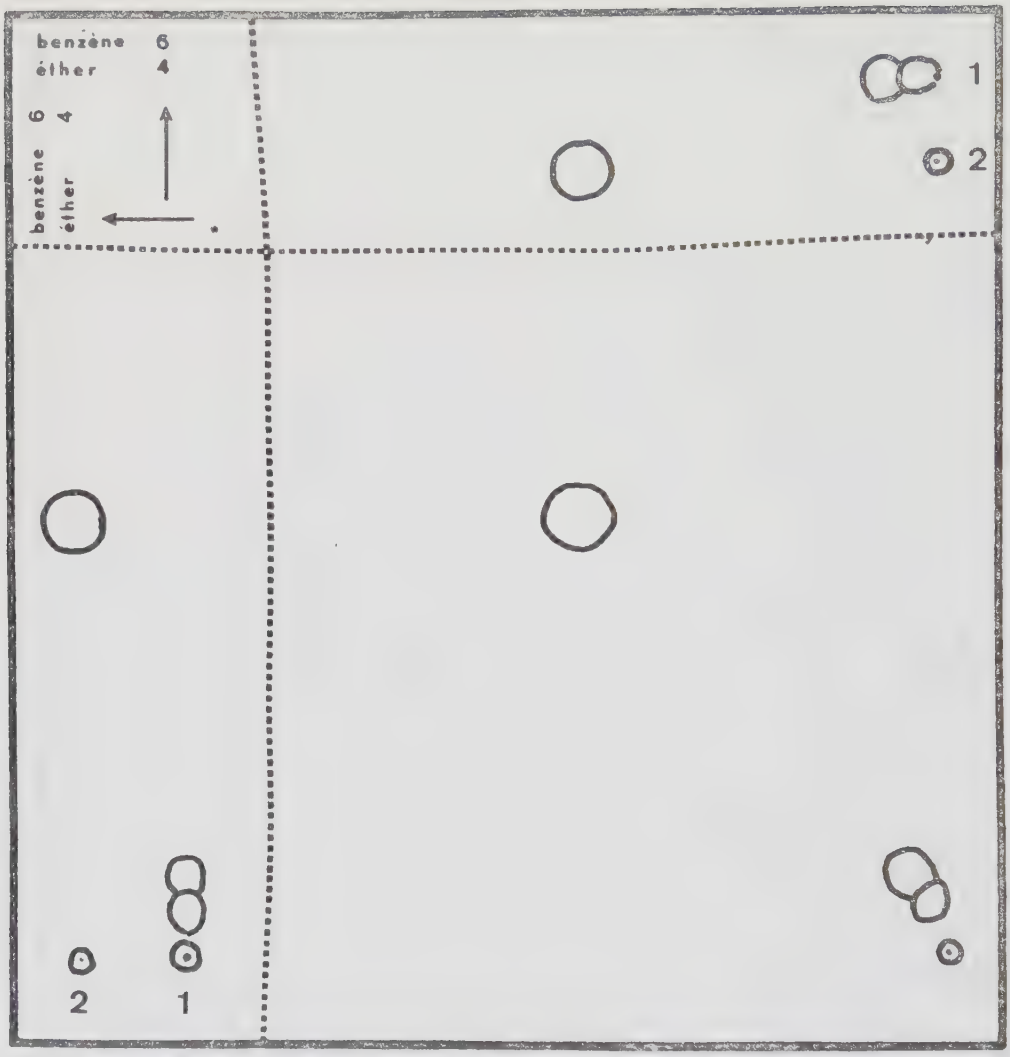


GRAPHIQUE N° 18

Chromatographie bidimensionnelle d'un extrait urinaire réalisé après hydrolyse acide.

Rat éprouvé à la dichlorocyclohexanone géminée.

1 = Cis + Trans Cyclohexanediols 1-2



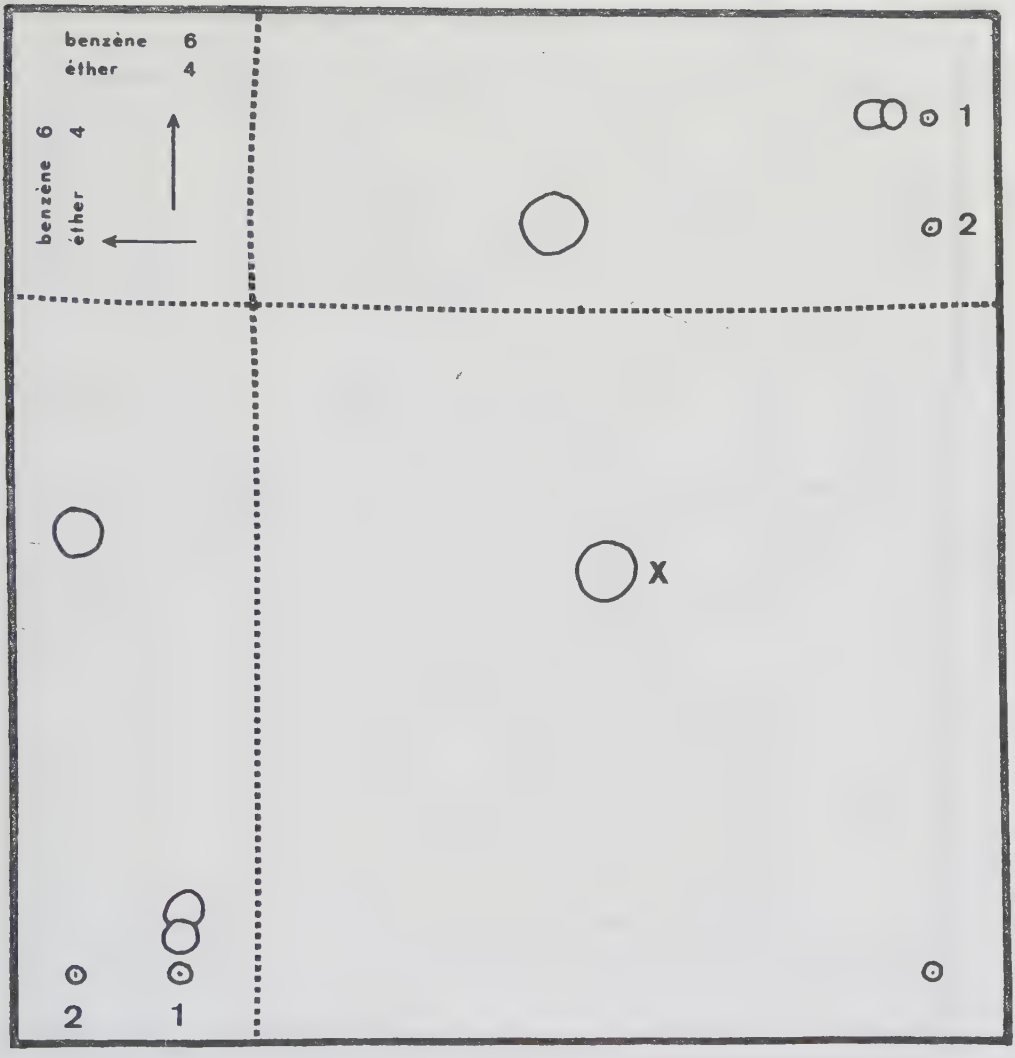
GRAPHIQUE N° 19

Chromatographie bidimensionnelle d'un extrait urinaire réalisé après hydrolyse acide.

Rat éprouvé à la dichlorocyclohexanone trans.

1 = Cis + trans Cyclohexanediol 1-2

2 = Cis Chloro-2-cyclohexanol



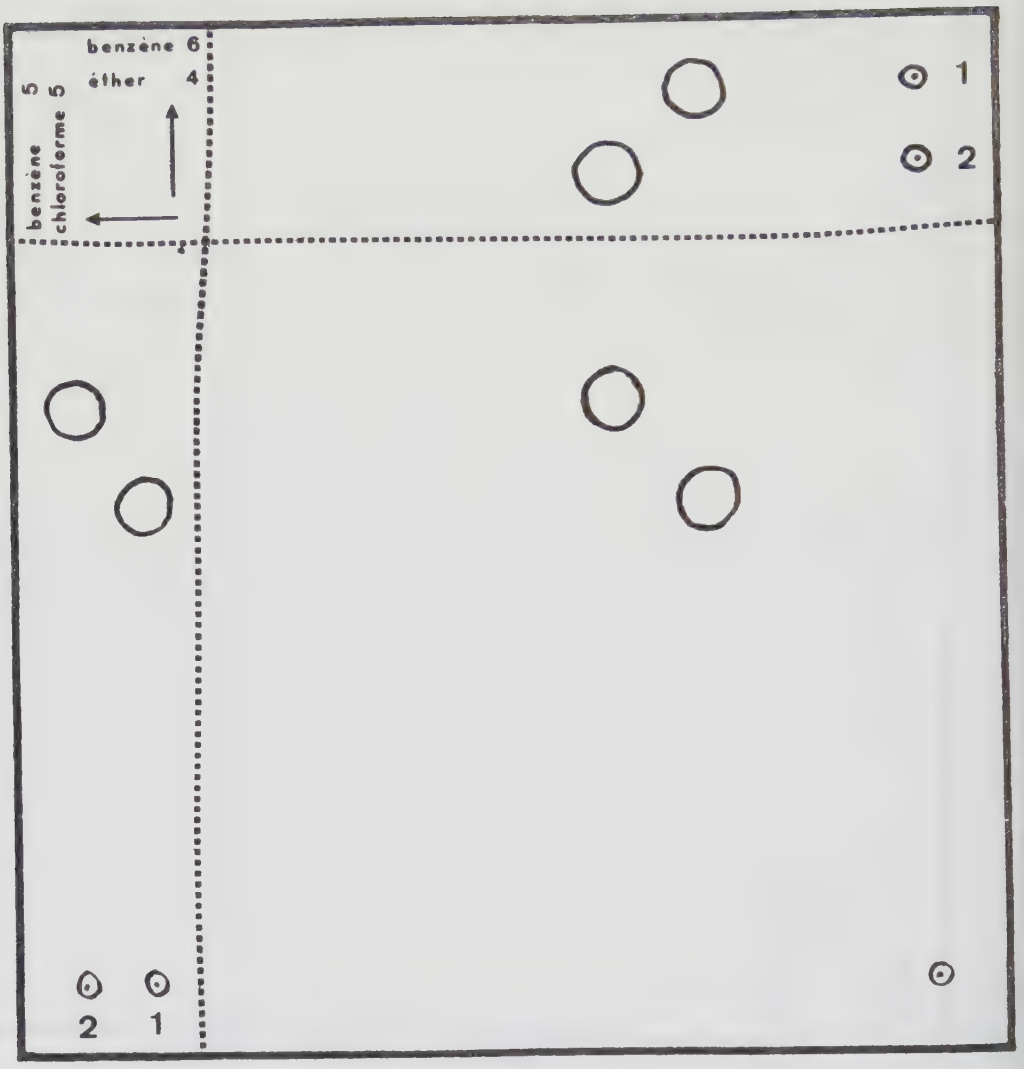
GRAPHIQUE N° 20

Chromatographie bidimensionnelle d'un extrait urinaire réalisé après hydrolyse acide.

Rat éprouvé au dichlorocyclohexanol géminé

1 = Cis + trans cyclohexanediol 1.2

2 = Cis Chloro-2-Cyclohexanol



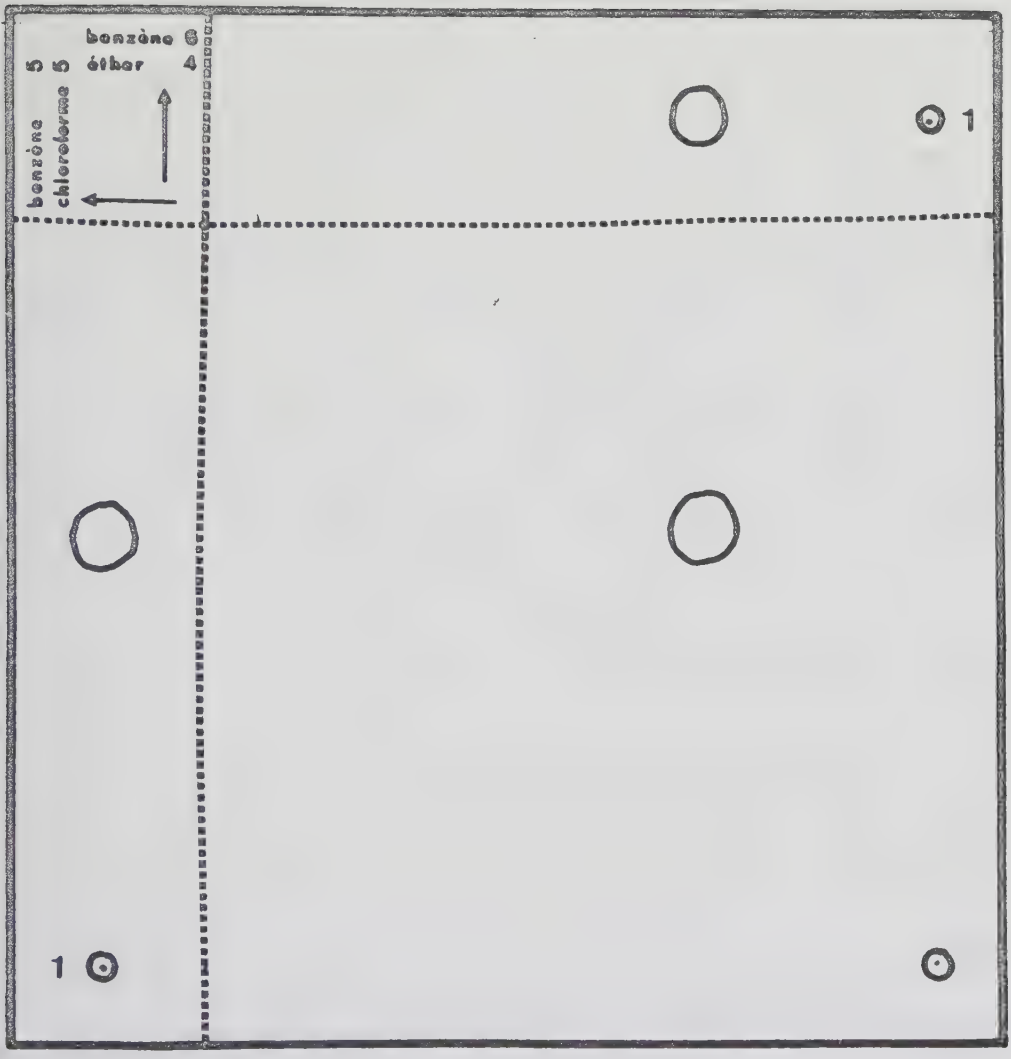
GRAPHIQUE N° 21

Chromatographie bidimensionnelle d'un extrait urinaire réalisé après hydrolyse acide.

Rat éprouvé à la dichlorocyclohexanone cis

1= Dichlorocyclohexanol cis-trans

2= Dichlorocyclohexanol cis-cis

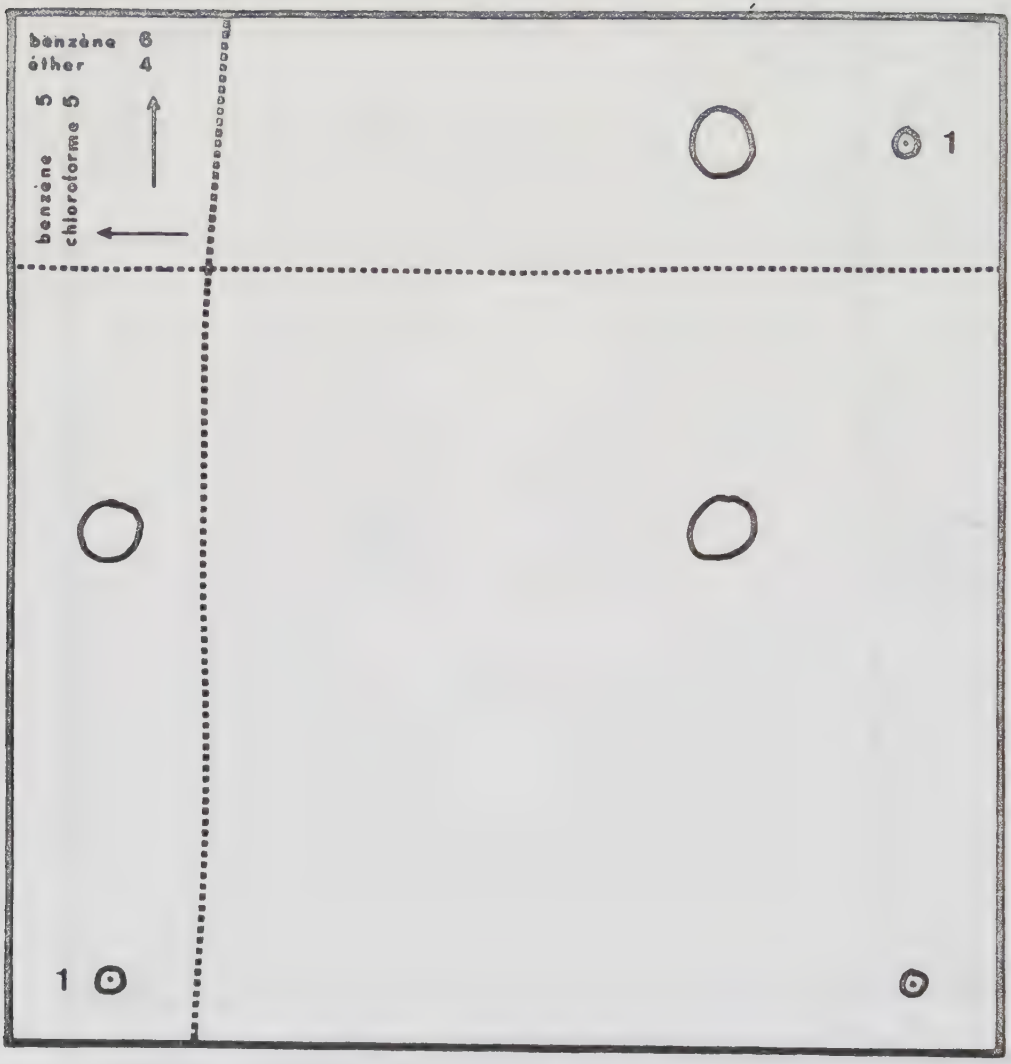


GRAPHIQUE N° 22

Chromatographie bidimensionnelle d'un extrait urinaire réalisé après hydrolyse enzymatique.

Rat éprouvé au dichlorocyclohexanol cis-trans

1 = dichlorocyclohexanol cis-trans



GRAPHIQUE N° 23

Chromatographie bidimensionnelle d'un extrait urinaire réalisé après hydrolyse enzymatique.

Rat éprouvé à la dichlorocyclohexanone géminée.

1 = Dichlorocyclohexanol géminé.

Après épreuve au dichlorocyclohexanol géminé, les cis et trans cyclohexanediols 1-2 n'ont pas été mis en évidence dans les conditions expérimentales adoptées.

Ces deux substances constituent une des formes d'élimination de nombreux dérivés cyclohexaniques et plus particulièrement des dérivés cyclohexaniques oxydés et hydroxylés. Ce fait nous a semblé justifier l'engagement de la technique de séparation chromatographique réalisée sur colonne de gel de silice que nous avons décrite précédemment (p.73). Nous avons pu ainsi mettre en évidence après épreuve à l'alcool géminé, la présence de très faibles quantités de ces deux alcools stéréoisomères.

Il convient de souligner que la technique de chromatographie sur couches minces n'a pas révélé la présence des composés suivants, métabolites présumés des substances étudiées :

- Dichlorocyclohexanol trans-trans
- Chloro-2-cyclohexanol trans
- Cyclohexanone
- Chloro-2-cyclohexanone
- Chloro-2-cyclohexène-2-3-one-1
- Composés aromatiques (DANG QUOC QUAN, 1961, WILLIAMS R. T., 1959)

β) Par chromatographie en phase vapeur

Les résultats acquis sont présentés sur les graphiques n° 24 et 25. La chromatographie en phase vapeur nous a permis de confirmer les résultats précédemment atteints.

D'autre part quelques informations supplémentaires ont pu être acquises grâce à cette technique.

- quelle que soit l'épreuve envisagée, les quantités de cis et trans cyclohexanediols 1-2 mises en évidence demeurent faibles.

- Dans le cas de l'épreuve à la dichlorocyclohexanone géminée et au dichlorocyclohexanol géminé, nous avons pu observer la présence en quantité notable d'un

métabolite X présentant sur colonne de SE. 30 un temps de rétention de l'ordre de 2,3 minutes. Il est permis de supposer que cette substance est identique à celle mise en évidence sur C.C.M.

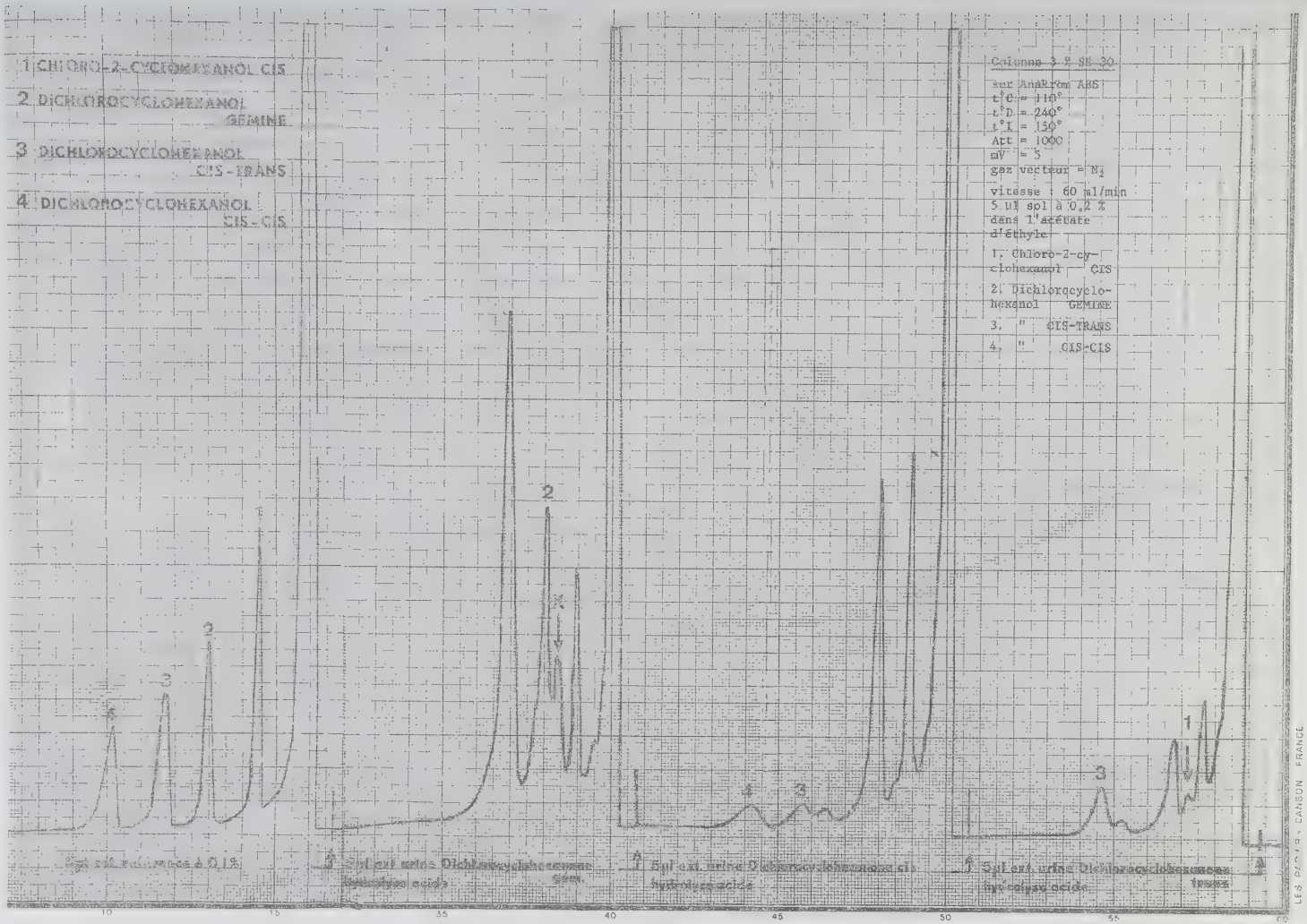
- Une évaluation de l'élimination urinaire sous forme de dichlorocyclohexanols cis-cis et cis-trans a pu être réalisée après épreuve à la dichlorocyclohexanone cis et au dichlorocyclohexanol cis-cis. Pendant les 24 heures qui suivent l'administration du produit, les pourcentages relatifs revenant à l'isomère cis-cis et à l'isomère cis-trans dans l'élimination sous forme de dichloroalcools sont respectivement :

Epreuve à la dichlorocyclohexanone cis

Δt Intervalle de temps	% cis-cis	% cis-trans	$R = \frac{\% \text{ cis-cis}}{\% \text{ cis-trans}}$
0 - 6h.	13,4	3,4	4
6h.- 12h.	11,2	7,4	1,5
12h.- 24h.	20	44	0,45
0 - 24h.	44,4	54,8	0,81

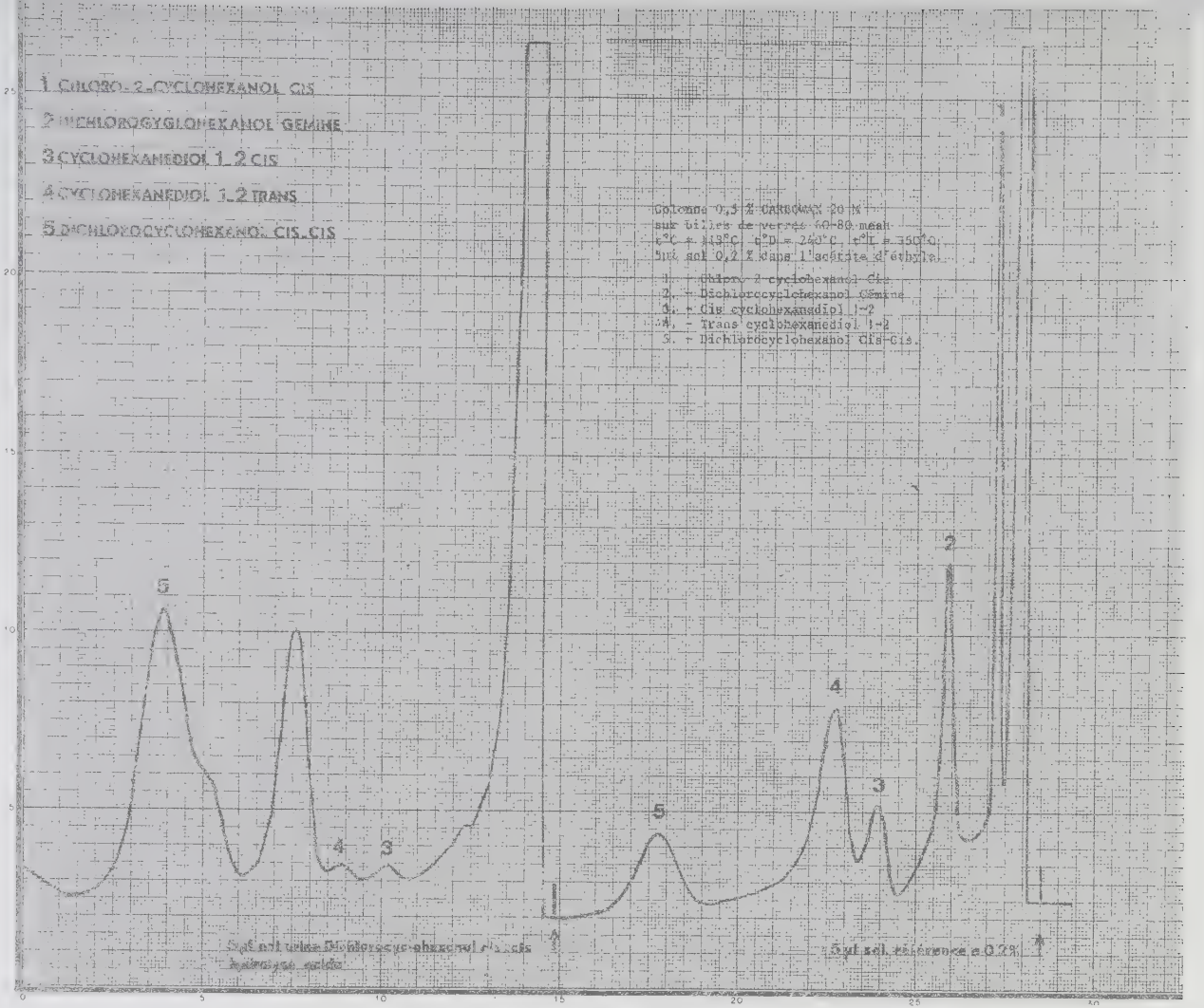
Epreuve au dichlorocyclohexanol cis-cis

Δt	% cis-cis	% cis-trans	$R = \frac{\% \text{ cis-cis}}{\% \text{ cis-trans}}$
0 - 6h.	24,5	4,3	6
6h.- 12h.	9,8	3,9	2,5
12h.- 24h.	45,4	11,2	3,9
0 - 24h.	79,7	19,4	4,1



GRAPHIQUE N° 24

CHROMATOGRAPHIE EN PHASE VAPEUR D'EXTRAITS



GRAPHIQUE N° 25

Notons que la cinétique de l'élimination sous forme de dichloroalcools (cis-cis et cis-trans) demeure comparable à la cinétique de l'élimination sous forme glucuroconjuguée : le maximum de l'élimination sous ces deux formes se réalise entre 12 et 24 h.

Si l'on considère la faible part qui revient à l'élimination sous forme des cis et trans cyclohexanediols 1-2, il est par conséquent permis de conclure que les métabolites principaux de la dichlorocyclohexanone cis et de l'alcool cis-cis sont les glucuroconjugués des dichlorocyclohexanols cis-cis et cis-trans.

C) Recherche des acides mercapturiques

JAMES S. P. et JEFFERY D. J., 1964 ont montré que l'administration de bromocyclohexane au lapin conduit à l'élimination urinaire,

- d'un composé ayant le même comportement chromatographique que l'acide cyclohexylmercapturique,

- d'un métabolite inconnu présentant les caractéristiques d'un acide mercapturique.

CAHUZAC A. M., 1970 a mis en évidence chez le Rat la présence d'un composé possédant toutes les caractéristiques de l'acide hydroxy-2-cyclohexylmercapturique, après administration de chloro-2-cyclohexanone et des chloro-2-cyclohexanols cis et trans.

En appliquant la technique de chromatographie sur papier décrite précedemment, nous n'avons pu déceler dans les urines des Rats traités aux dichlorocyclohexanones et aux dichlorocyclohexanols isomères la présence d'aucun métabolite possédant les caractéristiques d'un acide mercapturique.

L'acetylcysteyldéchloration, mise en jeu dans le cas des dérivés monochlorés de la cyclohexanone et du cyclohexanol, n'intervient donc pas dans le processus de détoxication des homologues dichlorés.

D) Conclusions

1.- Nous avons consigné dans les tableaux n° 17 et 18 les résultats de l'étude métabolique concernant les 3 dichlorocétones et les 3 dichloroalcools cyclohexaniques ; seul le métabolite X n'a pu être identifié.

2.- Si l'on considère que les trois dichloroalcools isomères (P.M. = 169) représentent les principaux métabolites glucuroconjugués, on peut établir la valeur du métabolisme % au temps t = 32 h., en fonction de la dose administrée, témoins déduits.

Cette valeur est déterminée à partir de l'égalité :

$$M\ \% = \frac{Q - Q'}{A} \times \frac{PM}{PM'} \times 100$$

A = Quantité de produit administrée à 1 sujet exprimée en mg.

Q = Quantité d'acide glucuronique éliminée par un sujet traité en 32 h. exprimée en mg.

Q' = Quantité d'acide glucuronique éliminée par un sujet témoin en 32 h. exprimée en mg.

PM = Poids moléculaire du métabolite susceptible de se glucuroconjuguer.

PM' = Poids moléculaire de l'acide glucuronique = 194.

Les valeurs du métabolisme % sont réunies ci-dessous.

Produit administré (voie orale) 1 mM/Kg		Métabolisme %
Dichlorocyclohexanones	GEMINEE	22,5 %
	CIS	30,6 %
	TRANS	29,6 %
Dichlorocyclohexanols	GEMINE	29 %
	CIS-CIS	27 %
	CIS-TRANS	21,2 %

TABLEAU N° 17

Biotransformation des dichlorocyclohexanones

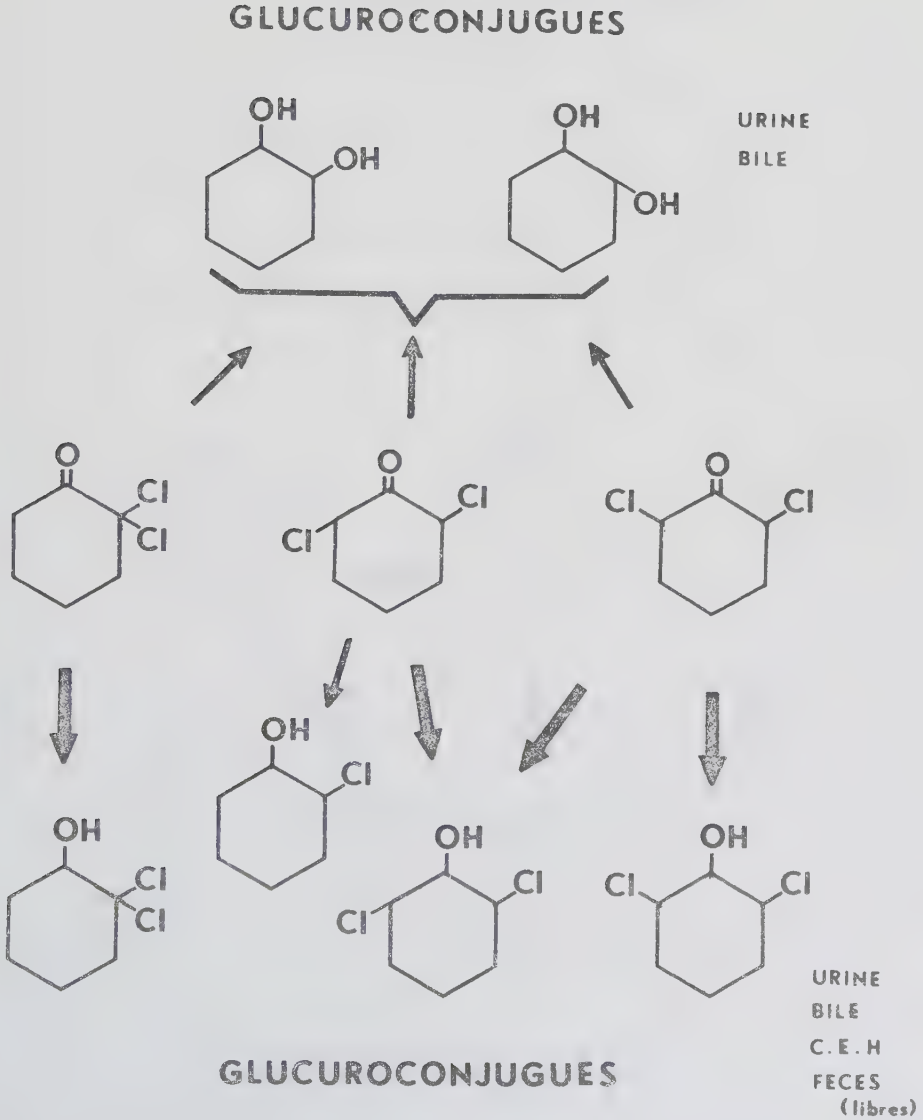
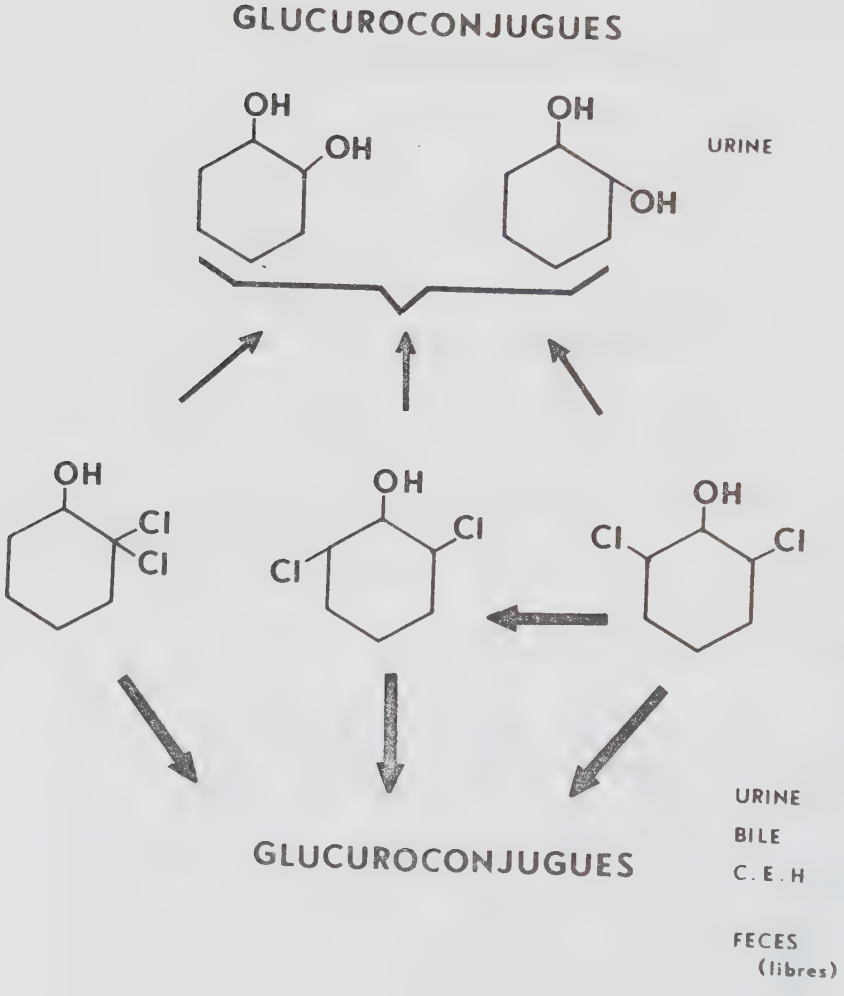


TABLEAU N° 18

Biotransformation des dichlorocyclohexanols



3.- La glucuroconjugaison n'intervient pas de façon prépondérante dans l'élimination urinaire des 6 substances étudiées. La faible hydrosolubilité de ces dérivés (tableaux n° 1 et 2) permettrait d'expliquer ce fait : comme toutes les substances liposolubles, elles seraient fortement fixées dans l'organisme et ne seraient libérées que très lentement.

De plus, la voie urinaire ne serait pas le seul émonctoire mis en jeu.

CHAPITRE II

ETUDE DE L'ELIMINATION BILIAIRE ET FECALE

I - DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

Les dichlorocyclohexanols glucuroconjugués constituent la principale forme de l'élimination urinaire des dichlorocyclohexanones et des dichlorocyclohexanols étudiés. Le pourcentage de l'élimination urinaire sous forme de glucuroconjugués ne dépasse jamais 20 à 30 % de la dose administrée. Ces résultats nous ont conduit à envisager l'étude des éliminations biliaire et fécale qui peuvent constituer des voies d'élimination secondaire.

L'importance de l'étape biliaire a déjà été soulignée (CAUJOLLE F. et MEYNIER D., 1946, et ROBELET A. et GUERRIN F., 1966).

Le devenir d'une substance dans l'organisme peut être ainsi schématisé :

- administrée par la voie orale, la substance atteint le foie par la voie du système veineux porte et du réseau lymphatique, où elle subit éventuellement des transformations (réduction, hydroxylation et surtout conjugaison).

- la substance ou ses métabolites passent ensuite de la cellule hépatique vers les capillaires biliaires et la bile.

- a partir de la bile, deux voies d'élimination sont possibles :

. la substance ou ses métabolites peuvent être éliminés par les fèces après traversée de l'intestin grêle et du côlon ; à ce niveau il faut tenir compte de l'action possible des bactéries intestinales.

. la substance ou ses métabolites sont susceptibles d'être réabsorbés au niveau de l'intestin grêle et de revenir ainsi au foie. Cette possibilité de cycle entéro-

hépatique aboutit à une nouvelle élimination biliaire ou à l'élimination rénale.

WILLIAMS R. T. et al., 1965, ont souligné le rôle prépondérant des transformations métaboliques et plus particulièrement des conjugaisons, ainsi que l'aspect et le rôle des conjugués dans la circulation entéro-hépatique. Selon ces auteurs :

- l'excrétion biliaire est fonction, dans une certaine mesure, du poids moléculaire, le passage dans la bile augmentant quand le poids moléculaire croît ;

- la présence d'un second groupement OH sur la molécule augmente la conjugaison et l'excrétion biliaire.

Dans l'intestin, le devenir possible des conjugués est le suivant :

- ils peuvent être hydrolysés par les enzymes présentes dans les sécrétions intestinales, et par la flore bactérienne. L'hydrolyse redonne alors le composé original si celui-ci a été directement conjugué, ou le métabolite. Les substances ainsi libérées peuvent être, soit véhiculées par le sang, soit excrétées dans les fèces, soit ultérieurement métabolisées par les bactéries intestinales.

- ils peuvent être excrétés inchangés dans les fèces.

Ces données nous ont permis de prévoir que les substances étudiées dont le poids moléculaire est de 167 et 169, seraient éliminées, non pas sous forme libre, mais sous forme de glucuronides.

Nous avons ensuite essayé dans un premier temps de mettre en évidence l'existence d'un cycle entéro-hépatique, puis de déterminer la nature des formes d'élimination fécale.

II - ELIMINATION BILIAIRE ET REABSORPTION INTESTINALE

A) Collecte de la bile

Des Rats mâles pesant de 250 à 300 g, à jeun depuis 12 heures, ont été anesthésiés à l'uréthane par voie sous-cutanée (1,25 g/kg).

Les substances étudiées ont été administrées par la voie orale, à la dose de 1 mM/kg, et en solution à 10 % dans l'H.O.N.

La canulation du cholédoque est pratiquée immédiatement après l'administration du produit.

La bile est recueillie pendant 5 heures et les échantillons sont placés ensuite à -30°C afin d'assurer leur conservation.

Nous avons vérifié l'existence d'un cycle entéro-hépatique, selon la technique de HUCKER H. B. et al., 1966, décrite pour le Rat par FONTAINE L. et al., 1968. Le catether choledocien du Rat anesthésié est implanté dans le duodénum d'un second Rat, endormi de la même façon. Le plan abdominal du second Rat est placé 5 à 10 cm au-dessous du premier. La bile excrétée par le second Rat est recueillie pendant 5 heures.

B) Dosage des formes glucuroconjuguées

1/ Techniques expérimentales

Nous avons dosé l'acide glucuronique dans la bile recueillie après fistulisation du canal cholédoque.

Des essais préliminaires nous ont permis de trouver la concentration adéquate de la prise d'essai en acide glucuronique, et partant, la dilution de la bile en vue du dosage. A 0,05 ml de bile on ajoute 0,95 ml d'eau distillée, puis le dosage est effectué sur 0,5 ml de cette dilution, suivant la technique de JAYLE M. F. précédemment décrite.

La bile recueillie pendant les 20 premières minutes d'excrétion sert de témoin. Après administration

de la substance par la voie orale, les échantillons de bile sont collectés toutes les 30 minutes pendant 2 h 30 puis toutes les heures pendant les deux heures suivantes.

2/ Résultats expérimentaux

Le graphique n° 26 représente la cinétique de l'élimination de l'acide glucuronique.

Ce graphique montre que les animaux éprouvés aux dichlorocyclohexanones et aux dichlorocyclohexanols symétriques éliminent notablement moins de glucuronides que les animaux recevant la cétone et l'alcool géminés.

La vitesse de l'élimination biliaire des glucuroconjugués est maximale au bout de 60 minutes pour les deux isomères géminés, de 90 minutes pour les isomères trans et cis-trans et enfin de 2 heures dans le cas des dérivés cis et cis-cis.

C) Recherche des formes glucuroconjuguées

1/ Techniques expérimentales

Nous avons réalisé des extraits pour chromatographie sur couches minces, selon la technique précédemment décrite.

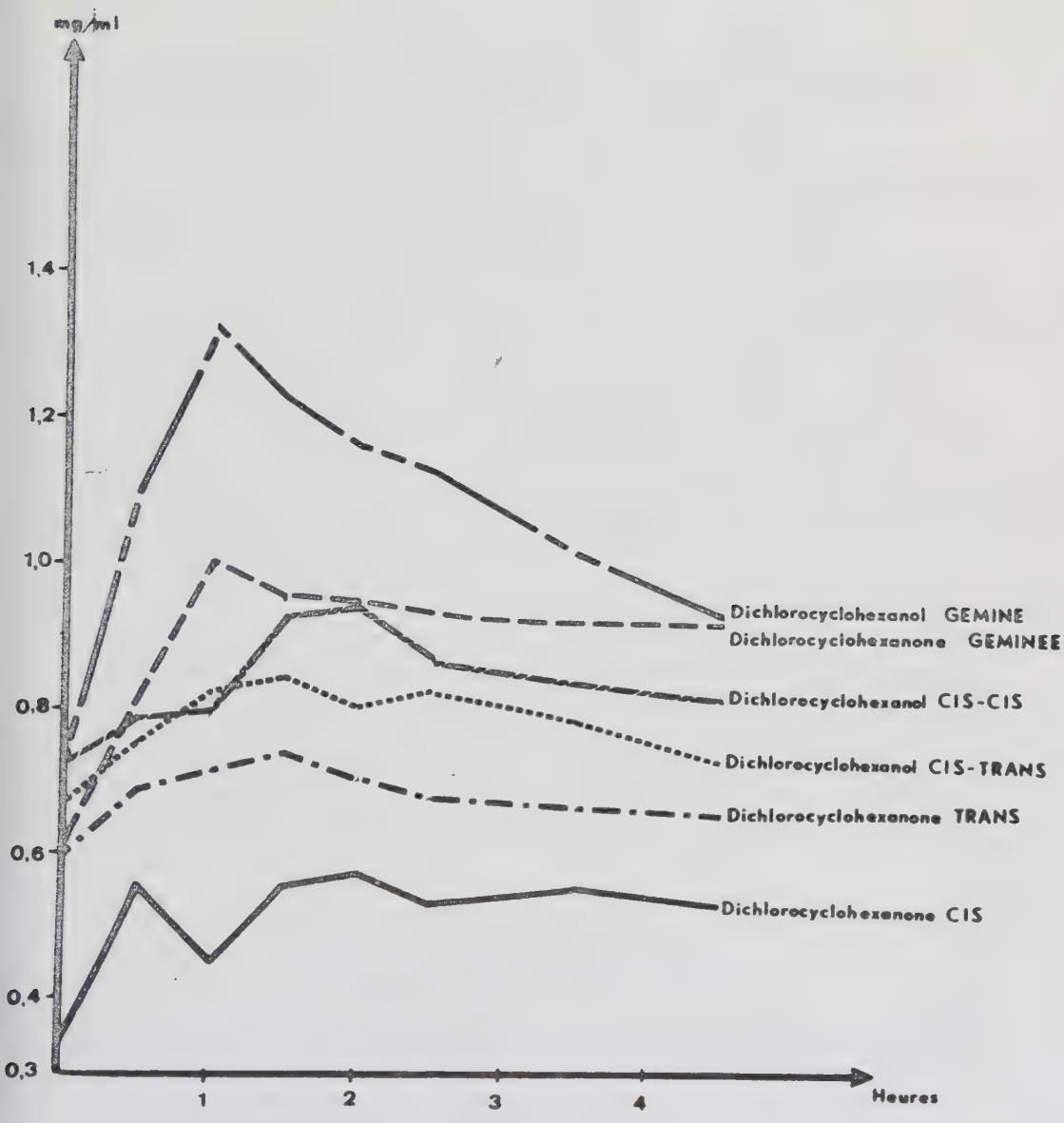
On procède à une extraction par l'acétate d'éthyle sur une partie aliquote de l'échantillon avant toute hydrolyse.

L'autre partie subit une hydrolyse chlorhydrique, avant son extraction dans les mêmes conditions.

Des extraits ont été ainsi réalisés à partir de la bile recueillie directement et après vérification du cycle entéro-hépatique.

2/ Résultats expérimentaux

Nous avons pu mettre en évidence les métabolites suivants :



GRAPHIQUE N° 26

Elimination biliaire de l'acide glucuronique

- le glucuroconjugué du dichlorocyclohexanol géminé dans le cas de l'épreuve à la dichlorocétone géminée et au dichloroalcool géminé.

- le glucuroconjugué du dichlorocyclohexanol cis-trans dans le cas de l'épreuve à la dichlorocétone trans et au dichloroalcool cis-trans.

- le glucuroconjugué du dichlorocyclohexanol cis-cis, accompagné de traces du glucuroconjugué du dichloroalcool cis-trans, dans le cas de la cétone cis et de l'alcool cis-cis.

Les dichloroalcools ne sont en aucun cas retrouvés à l'état libre dans la bile.

De très faibles quantités de cis et trans cyclohexanediols 1-2 sont susceptibles de subir un transfert hépatobiliaire, uniquement après épreuve aux trois dichlorocétones.

Les essais de vérification du cycle entéro-hépatique ont permis de retrouver uniquement le glucuroconjugué de chacun des trois dichloroalcools stéréoisomères. Ces métabolites sont donc soumis à un cycle entéro-hépatique alors que les cis et trans cyclohexanediols 1-2 présents dans la bile du premier Rat ne franchissent pas la barrière intestinale en quantités décelables.

III - ELIMINATION FECALE

A) Protocole expérimental

Les animaux destinés à l'étude de l'élimination fécale sont placés dans les mêmes conditions expérimentales et éprouvés aux mêmes doses que lors de l'étude de l'élimination urinaire.

Des lots de 4 animaux sont constitués et les fèces sont réunis au bout de 48 heures.

Technique d'extraction

Les fèces sont broyés au mortier, mis en suspension dans 50 ml d'une solution d'acide chlorhydrique 0,1 N et sont soumis à une agitation magnétique de 15 minutes.

Sur une partie aliquote de la phase aqueuse obtenue après centrifugation, on procède à une hydrolyse chlorhydrique.

On réalise sur le reste de la phase aqueuse d'une part, et sur l'hydrolysat acide d'autre part, trois extractions par un volume d'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont ensuite réunies et filtrées sur charbon actif. L'utilisation de cet adsorbant s'est avérée nécessaire afin d'éliminer les pigments susceptibles de perturber l'interprétation des chromatogrammes. Un essai préalable nous a permis de nous assurer que les métabolites présumés n'étaient pas retenus par le charbon actif.

Le solvant est ensuite évaporé sous pression réduite et le résidu repris par 0,2 ml d'acétate d'éthyle.

B) Résultats expérimentaux

L'examen en chromatographie sur couches minces des extraits de fèces a permis d'atteindre les résultats suivants :

- avant toute hydrolyse, chacun des trois dichloroalcools est retrouvé à l'état libre.

- l'hydrolyse acide n'augmente nullement les quantités de métabolites présentes avant l'hydrolyse et ne fait apparaître aucun spot nouveau.

IV - CONCLUSION

Cette étude a permis de mettre en évidence :

- dans la bile, les glucuroconjugués des trois dichlorocyclohexanols stéréoisomères, et les cis et trans cyclohexanediols 1-2. ces deux composés sont retrouvés en

très faible quantité après l'administration des trois dichlorocétones uniquement. Les deux dihydrodiols sont donc susceptibles de passer dans la bile si la concentration dans le milieu intérieur est suffisamment importante(CAUJOLLE D. et al., 1970).

- l'existence d'un cycle entéro-hépatique intéressant les glucuroconjugués des trois dichloroalcools stéréoisomères.

- dans les fèces, la forme libre de ces mêmes alcools dichlorés (GENOLINI C.et CAHUZAC A. M., 1971).

Les trois alcools isomères subissent au niveau du foie une glucuroconjugaison ; la forme glucuroconjuguée, après passage dans la bile, est hydrolysée au niveau intestinal sous l'influence de la flore bactérienne ; la forme libre est alors susceptible de franchir la barrière intestinale et de subir une nouvelle conjugaison au niveau du foie. Les trois dichloroalcools sont donc progressivement éliminés du milieu intérieur, en grande partie dans l'urine sous forme glucuroconjuguée, en plus faible part dans les fèces sous forme libre. Ces observations sont en accord avec les hypothèses formulées par WILLIAMS R. T. et al., 1965.

CHAPITRE III

CONCLUSIONS ET DISCUSSIONS

Le tableau n° 17 résume les résultats que nous avons atteints au cours de notre étude.

1°) La présence des dichlorocyclohexanols isomères dans les excreta des Rats éprouvés au dichlorocyclohexanones pose le problème du mode de réduction des cétones cyclohexaniques et de la bio-isomérisation des alcools ainsi formés.

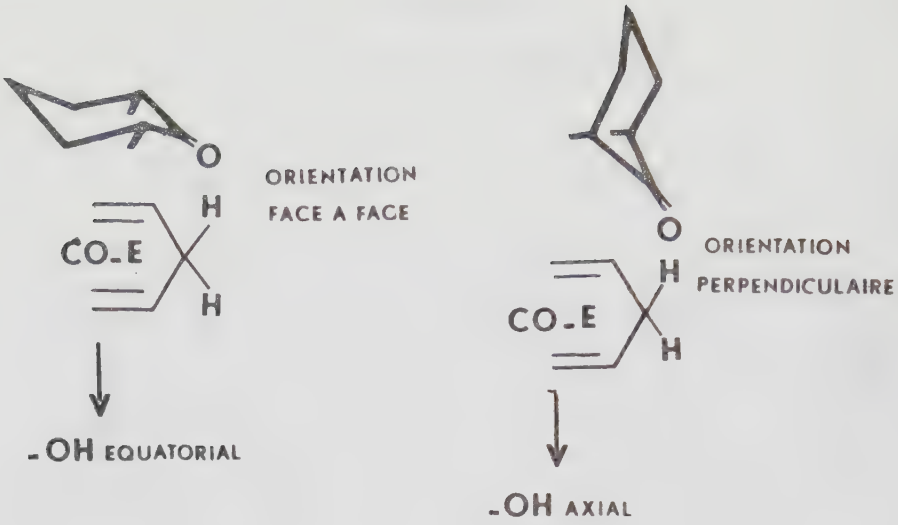
Une étude complète du mécanisme d'oxydo-réduction des cétones/alcools cyclohexaniques a été présentée par MERRIT A. D. et TOMKINS G. M., 1959, DALZIEL K. et al., 1966, GRAVES J. M. et al., 1965. Ces auteurs ont étudié, in vitro, l'action de l'alcool-deshydrogénase du foie de cheval en présence de NAD ou de NADH, sur les systèmes cyclohexanol/cyclohexanones et leurs dérivés méthylés, buthylés et monochlorés.

$$\text{Cyclohexanone} + NADH_2 \xrightarrow{ADH} NAD^+ + \text{Cyclohexanol}$$

Dans le cas des dérivés chlorés, la chloro-2-cyclohexanone est rapidement réduite, tandis que dans les mêmes conditions, le trans chloro-2-cyclohexanol n'est pas oxydé, ce qui tend à prouver que la réduction de la chlorocétone entraîne presque uniquement la formation du cis chloro-2-cyclohexanol. Ces résultats peuvent être rapprochés de ceux obtenus in vivo par CAHUZAC A. M., 1970, qui a démontré que le cis chloro-2-cyclohexanol était le métabolite majeur, dans le cas de l'épreuve à la chloro-2-cyclohexanone.

ELLIOTT T. H. et al., 1965, 1969, CHEO K. L., et al., 1967, ont étudié in vitro et in vivo le métabolisme des butyl-et méthyl-cyclohexanones et cyclohexanols. Ces auteurs ont formulé plusieurs remarques.

* La cétone peut avoir deux orientations différentes vis à vis du coenzyme :



Mais la cétone réagit dans sa conformation la plus stable et s'oriente préférentiellement "face à face" avec le coenzyme. L'alcool qui constituera le métabolite majeur possédera donc le groupement OH en position équatoriale.

* La formation de deux alcools stéréoisomères à partir d'une même cétone signifie que le substrat a pris à la fois l'orientation "face à face" et "perpendiculaire" par rapport au coenzyme (CHEO K. L. et al., 1967).

* La formation de deux alcools stéréoisomères à partir d'un même alcool (cis ou trans) ne peut être expliquée que par le passage par une cétone intermédiaire (ELLIOTT T. H. et al., 1969).

* La nécessité d'une bio-isomérisation dans le cas d'un alcool s'explique in vivo, par le fait que l'acide glucuronique se conjugue préférentiellement avec l'alcool qui possède un hydroxyle en position équatoriale.

Les résultats acquis avec les cétones géminée et trans et les alcools géminé et cis-trans, ainsi que leur étude conformationnelle, nous permettent de penser que ces mêmes mécanismes sont mis en jeu.

La biostéréoisomérisation que subissent la dichlorocyclohexanone cis et le dichlorocyclohexanol cis-cis ne peut être expliquée par les processus précédemment décrits.

Si la réduction chimique de la cétone cis donne naissance aux deux alcools cis-cis et trans-trans, la réduction biochimique entraîne la formation de l'alcool cis-trans à côté de celle du cis-cis. Le déplacement d'un atome de chlore dans le plan de la molécule ne peut se produire sous l'action d'un système enzymatique d'oxydoréduction ; il faut supposer que ce déplacement interviendrait grâce à un mécanisme de déhalogénation/réhalogénation.

2°) Il est remarquable de constater la présence des cyclohexanediol 1-2 cis et trans, en tant que métabolites communs à tous les dérivés qui font l'objet de notre étude. Cette hydroxylation du noyau cyclohexanique semble être le processus le plus généralement engagé in vivo. Les 2 dihydrodiols sont retrouvés parmi les métabolites du cyclohexane, de la cyclohexanone et du cyclohexanol (ELLIOTT T. H. et al., 1959, VIOLA P. L., 1966), du bromocyclohexane (JAMES S. P. et al., 1970) et de quelques dérivés cyclohexaniques monohalogénés (CAHUZAC A. M., 1970).

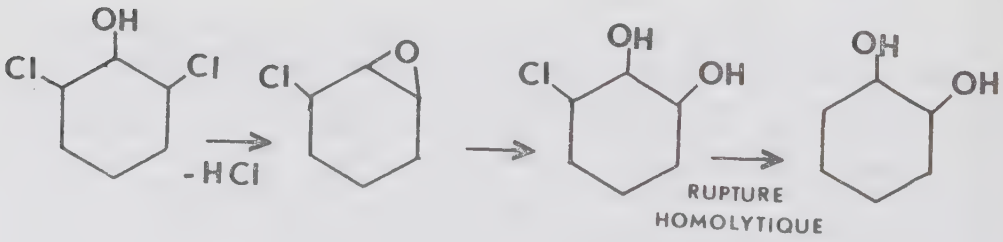
Si les réactions d'hydroxylations et d'hydroxydechlorations, décrites dans le cas d'halogénoalkane par CASTRO C. E. et BARTNICKI E. W., 1965 et 1968, interviennent fréquemment, par contre, la transformation de dérivés cyclohexaniques dichlorés symétriques en ces mêmes dihydrodiols, pose le problème d'une déchloration non oxydative d'un des carbones. Cette réaction n'est pas courante in vivo. Elle a été décrite par JONDORF W. R. et al., 1957, dans le cas de l'hexachloroéthane et par BUTLER T. C., 1961, dans le cas du tétrachlorure de carbone. Cet auteur a tenté d'élucider le mécanisme de cette réaction : la rupture de la liaison carbone-halogène se fait, d'une manière générale,

de façon hétérolytique et l'halogène emporte avec lui les deux électrons de la liaison. Cependant il existe un autre mode de rupture de cette liaison : c'est la rupture homolytique dans laquelle un des électrons de la liaison est retenu, d'une part par l'halogène, d'autre part par le radical organique. Chacune des deux parties doit acquérir un électron célibataire à partir d'une source extérieure et atteindre ainsi la stabilité de l'octet. Le radical organique accepte donc un électron et un ion hydrogène, et un deuxième électron doit être fourni au chlore. La cystéine, le glutathion, l'acide ascorbique, le cytochrome C et d'autres constituants cellulaires peuvent fournir ces électrons de manière non enzymatique, à la température et au pH physiologiques.

Cette acquisition d'électrons venant de composés étrangers serait responsable des serieux dommages constatés au niveau de la cellule hépatique.

Ces données nous permettent de penser que la formation des cyclohexanediols 1-2 cis et trans à partir des dichlorocyclohexanones et des dichlorocyclohexanols symétriques résulterait de la rupture homolytique d'une des liaisons carbone-chlore.

Cette rupture pourrait intervenir après la formation du dihydrodiol suivant le schéma :



Mais un autre mécanisme pourrait faire intervenir la rupture homolytique de la liaison C-Cl avant la formation du dihydrodiol et entraînerait l'élimination de chloro-2-cyclohexanol cis.

Or, c'est uniquement dans le cas de l'épreuve à la dichlorocétone trans que l'on a pu mettre en évidence de très faibles traces de chloro-2-cyclohexanol cis.

CONCLUSIONS GENERALES

1.- L'étude de la toxicité comparée des dichlorocyclohexanones géminée, cis et trans et des dichlorocyclohexanols géminé, cis-cis et cis-trans a été envisagée chez la Souris et chez le Rat.

Leur toxicité immédiate et différée, après administration intrapéritonéale et entérale a pu être précisée.

SOURIS

		IP		PO	
		DIL	DL 50 limite	DIL	DL 50 limite
ALCOOLS CETONES	GEMINEE	0,70	0,91	0,35	1,41
	CIS	0,062	0,137	0,20	0,43
	TRANS	0,025	0,067	0,11	0,29
	GEMINE	0,79	0,91	0,74	1,22
	CIS-CIS	0,41	0,56	0,59	1,48
	CIS-TRANS	0,81	0,96	0,76	1,43

RAT

		IP		PO	
		DIL	DL 50 limite	DIL	DL 50 limite
ALCOOLS CETONES	GEMINEE	0,41	0,59	1,24	2,7
	CIS	0,013	0,05	0,22	0,72
	TRANS	0,022	0,048	0,29	0,74
	GEMINE	0,29	0,53	0,74	1,3
	CIS-CIS	0,37	0,60	0,94	N.D.
	CIS-TRANS	0,35	0,48	1,26	N.D.

Dichlorocyclohexanones : L'agressivité de l'isomère géminé se montre toujours nettement inférieure à celle des isomères cis et trans qui, malgré des constantes physiques nettement différentes, offrent des

caractéristiques toxiques voisines.

Dichlorocyclohexanols : la voie d'administration détermine des résultats peu comparables.

- Par la voie I.P., l'ordre de toxicité croissante s'établit différemment selon l'espèce animale ; l'isomère cis-cis se montre, le plus agressif vis à vis de la Souris et le moins agressif à l'égard du Rat. Les isomères géminé et cis-trans présentent une activité similaire à l'égard de chaque espèce animale.

- Par la voie orale, l'isomère géminé, aussi bien chez le Rat que chez la Souris, se montre plus toxique que les deux autres isomères dont l'activité demeure comparable.

L'étude de l'agressivité comparée des dichlorocyclohexanones et des dichlorocyclohexanols nous a permis de voir que la réduction des trois dichlorocétones envisagées diminuait d'autant plus la toxicité que celle-ci était plus élevée.

2.- Les examens anatomopathologiques ont mis en évidence, chez la Souris comme chez le Rat éprouvés aux dichlorocyclohexanones cis et trans et au dichlorocyclohexanol cis-cis, une hépatite toxique à prédominance périportale, s'accompagnant d'une activité mitotique anormale des hépatocytes. Un début de régénérescence cellulaire à partir des zones centrolobulaires est observé après 48 heures.

3.- Les cétones cis et trans administrées à la D.I.L. abaissent la température centrale de 2 à 4°C ; la réponse des autres tests pharmacodynamiques engagés s'est révélée négative.

Parmi les quatre substances étudiées, les dichlorocyclohexanols géminé et cis-trans se distinguent par leur plus nette activité.

Les résultats obtenus avec les cétones et les alcools dichlorés ne permettent pas de dégager de notre étude des relations générales existant entre la

variation de la structure chimique et l'activité des couples d'isomères cis/trans.

4.- Le métabolisme se caractérise, dans le cas des dichlorocyclohexanones isomères, par la réduction de la fonction cétone, qui entraîne l'élimination urinaire des dichlorocyclohexanols correspondants.

Les trois alcools dichlorés ne subissent aucune transformation chimique de leur molécule.

Les alcools sont, dans tous les cas, glucuroconjugués ; cependant de faibles quantités de ces métabolites échappent à la conjugaison et sont retrouvés à l'état libre.

La présence des deux alcools isomères, cis-cis et cis-trans, dans les urines de Rats traités à la cétone cis et à l'alcool cis-cis, pose le problème de la bio-isomérisation des alcools in vivo.

Dans tous les cas étudiés, nous retrouvons de faibles quantités de cyclohexanediols 1-2 cis et trans ; ce phénomène d'hydroxylation apparaît toujours lors du catabolisme du noyau cyclohexanique.

L'élimination biliaire se caractérise par le passage dans la bile des glucuronides des trois dichlorocyclohexanols stéréoisomères. Les glucuronides des cyclohexanediols 1-2 cis et trans sont retrouvés en très faible quantité après l'administration des trois cétones uniquement.

L'existence d'un cycle entéro-hépatique intéressant les glucuroconjugués des trois dichloroalcools a été démontrée.

Dans les fèces les dichlorocyclohexanols isomères sont excrétés sous forme libre.

Vu Le Président du Jury

D. CAUJOLLE

Le Directeur
de l'U.E.R. des Sciences Pharmaceutiques

J. BREUILLAUD

Vu et Permis d'Imprimer
Toulouse, le 14 Octobre 1971
Le Président du Conseil
de l'Université PAUL-SABATIER

L. LARENG

BIBLIOGRAPHIE

1 - *AUVERGNAT R., GIRAUD R. et GIROLAMI A.*
Utilisation d'un nouveau milieu de suspension pour le microdosage des sulfates par opacimétrie.
Toulouse Pharmaceutique, 1966, 13, 53.

2 - *BARLETT P. D.*
Cis and trans chlorhydrins of cyclohexene.
J. Amer. Chem. Soc., 1935, 57, 224.

3 - *BLISS C. D.*
The determination of the dosage - mortality curve from small numbers.
Quart. J. Pharm. and Pharmacol., 1938, 11, 192.

4 - *BLOHM T. R., STEVENS V. L., KARIYA T. and ALIC H. N.*
Effect of Clomiphene cis and trans isomers on sterol metabolism in the Rat.
Biochem. Pharmacol., 1970, 19, 2231.

5 - *BURNS J. J., CUCINELL S. A., KOSTER R. and CONNEY A. H.*
Application of drug metabolism to drug toxicity studies.
Ann. N. Y. Acad. Sc., 1965, 123, 273.

6 - *BUTLER T. C.*
Reduction of carbon tetrachloride in vivo and reduction of carbon tetrachloride and chloroform in vitro by tissues and tissue constituents.
J. Pharmacol. Exptl. Therap., 1961, 134, 311.

7 - *CAHUZAC A. M.*
Etude toxicologique de trois dérivés de la série cyclohexanique : la chloro-2-cyclohexanone, le cis chloro-2-cyclohexanol, le trans chloro-2-cyclohexanol.
Thèse Pharmacie (Etat),Toulouse, 1970.

8 - *CAHUZAC A. M., CAUJOLLE D., CAUJOLLE F., DANG QUOC QUAN, VOISIN M. C.*
Influence de la chloruration en α sur la toxicité du cyclohexanol.
Toulouse Pharmaceutique, 1970, 17, N° 1, 3.

9 - *CASTRO C. E. and BARTNICKI E. W.*
Biological cleavage of carbon-halogen bonds. Metabolism of 3 bromopropanol by *Pseudomonas SP.*
Biochim. Biophys. Acta, 1965, 100, 384.

10 - *CASTRO C. E. and BARTNICKI E. W.*
Biodehalogenation. Epoxidation of halohydrins, epoxyde opening and transhalogenation by a *Flavobacterium SP.*
Biochemistry, 1968, 7, N°11 3213.

11 - *CAUJOLLE D., CAHUZAC A. M. et GENOLINI C.*
Metabolisme chez le Rat des dérivés cyclohexaniques : elimination biliaire de la chloro-2-cyclohexanone, des cis et trans chloro-2-cyclohexanols, des cis et trans cyclohexanediols 1-2.
Soc. Pharm. Toulouse. Séance du 18 Décembre 1970.

12 - *CAUJOLLE F., et MEYNIER D.*
L'étape biliaire des traversées chimiques dans l'organisme.
Revue du Foie. 1946, 5, 29.

13 - *CAUJOLLE F. et MEYNIER D.*
L'indice d'agressivité (D.L.50 limite).
Bull. Acad. Méd., 1957, 17, 362.

14 - *CAUJOLLE F. et MEYNIER D.*
Toxicité de l'estragole et des anétholes (cis et trans).
C. R. Acad. Sc., 1958, 246, 1465.

15 - *CAUJOLLE F. et MEYNIER D.*
Toxicité des isoeugenols.
C. R. Acad. Sc., 1959, 248, 2907.

16 - *CAUJOLLE F. et MEYNIER D.*
Activité hypothermisante dans les séries de l'eugenol et du safrol.
Ann. Pharm. Fr., 1960, 18, 601.

17 - *CAUJOLLE F., CAUJOLLE D. et CHIURDOGLU G.*
Toxicité des α chlorocyclanones de C_5 à C_6.
C. R. Acad. Sc., 1962, 254, 2683.

18 - *CAUJOLLE F., CAUJOLLE D. et CAUCAT J.*
Influence de la chloruration en α sur la toxicité des cyclanones de C_5 à C_8 pour la Souris.
Toulouse. Pharmaceutique, 1962, 9, N° 2, 4.

19 - *CAUJOLLE F., CAUJOLLE D. et FOULQUIER J. L.*
Influence de la cyclohexanone et de l'α chlorocyclohexanone sur le métabolisme basal du Rat.
Toulouse Pharmaceutique, 1964, 11, N° 2, 31.

20 - *CAUJOLLE D. et CAUJOLLE F.*
Gradient de toxicité des cyclanones.
C. R. Acad. Sc., 1965, 261, 1781.

21 - *CAUJOLLE F., CAUJOLLE D., DANG QUOC QUAN et CAHUZAC A. M.*
Relations entre la structure et l'activité pharmacodynamique des cyclanones et de leurs dérivés α chlorés.
Journées de Chimie thérapeutique. Strasbourg, 4-5 juillet 1966.

22 - *CAUJOLLE F. et DANG QUOC QUAN.*
Sur les α chloro et αα ou αα' dichlorocyclohexanols. Préparation et structure.
Ann. Pharm. Fr., 1969, 27, N° 7-8, 505.

23 - *CAUJOLLE F., CAUJOLLE D., DANG QUOC QUAN, GENOLINI C. et VOISIN M. C.*
Toxicité des αα et αα' dichlorocyclohexanols.
Toulouse Pharmaceutique, 1970, 17, N° 1, 13.

24 - *CAUJOLLE F., CAUJOLLE D., DANG QUOC QUAN, GENOLINI C. et MOISAND A.*
Métabolites urinaires chez le Rat des αα et αα' dichlorocyclohexanones et des αα et αα' dichlorocyclohexanols.
C. R. Soc. Biol., 1970, 164, N° 5, 1137.

25 - *CHEO K. L., ELLIOTT T. H. and TAO R. C. C.*
The metabolism of the isomeric tert. butylcyclohexanones.
Biochem. J., 1967, 104, 198.

26 - *COREY E. J.*
The stereochemistry of α haloketones.
II:the three α dibrominated cyclohexanones.
J. of Amer. Chem. Soc., 1953, 75, 3297.

27 - *DALZIEL K. and DICKINSON F. M.*
Substrate activation and inhibition in coenzyme-substrate reactions. Cyclohexanol oxydation catalysed by liver alcohol dehydrogenase.
Biochem. J., 1966, 100, 491.

28 - *DANG QUOC QUAN.*
Sur les dichlorocyclohexanones. L'isomérie géométrique.
C. R. Acad. Sc., 1959, 249, 426.

29 - *DANG QUOC QUAN.*
Etude polarographique de quelques cyclohexanones α chlorées.
C. R. Acad. Sc., 1960, 251, 2927.

30 - *DANG QUOC QUAN. et VILKAS M.*
Sur la chlorocyclohexénone.
C. R. Acad. Sc., 1960, 250, 2380.

31 - *DANG QUOC QUAN.*
Sur l'analyse structurale des α dichlorocyclohexanones par spectrométrie et moment dipolaire.
C. R. Acad. Sc., 1961, 252, 2247.

32 - *DANG QUOC QUAN.*
Etude physique et physico-chimique des α dichlorocyclohexanones.
Thèse Doct. ès Sciences,Paris, 1961.

33 - *DANYSK A., ZAREBSKI M., KILUK S. and BUCZKO W.*
Pharmacological properties of 2.2 diallylcyclohexanone and its hydration product.
Diss. Pharm. Pharmacol., 1970, 22, 2-3, 89.

34 - *ELLIOTT T. H., PARKE D. V. and WILLIAMS R. T.*
The metabolism of cyclo (C14) hexane and its derivatives.
Biochem. J., 1959, 72, 193.

35 - *ELLIOTT T.H., TAO R. C. C. and WILLIAMS R. T.*
Stereochemical aspect of the metabolism of the isomeric methylcyclohexanols and methylcyclohexanones.
Biochem. J., 1965, 95, 59.

36 - *ELLIOTT T. H., JACOB E. and TAO R. C. C.*
The, in vitro and in vivo, metabolism of optically active methylcyclohexanols and methylcyclohexanones.
J. Pharm. Pharmac., 1969, 21, 561.

37 - *FINNEY D. J.*
Probit analysis : a statistical treatment of the sigmoïd reponse curve.
London-Cambridge Univ. Press, 2ème ed., 1952.

38 - *FISHER R. A.*
Statistical methods for research works.
Section 27
OLIVER and BOYD Edinburgh, 1925.

39 - *FONTAINE L., BELLEVILLE M., LECHEVIN J. C. et TETE R.*
Etude du métabolisme de la méthyl-4-ombelliférone sur l'animal et chez l'homme.
Thérapie, 1968, XXIII, 373.

40 - *GENOLINI C. et CAHUZAC A. M.*
Métabolisme chez le Rat des dérivés cyclohexaniques : élimination biliaire et fécale des αα et αα' dichlorocyclohexanones et des αα et αα' dichlorocyclohexanols.
Soc. Pharm. Toulouse, Séance du 11 Février 1971.

41 - *GRAVES J. M., CLARK A. and RINGOLD H. J.*
Stereochemical aspects of the substrate. Specificity of horse liver alcohol dehydrogenase.
Biochemistry, 1965, 4, N° 12, 2655.

42 - *HOLYSZ R. P.*
J. of the Amer. Chem. Soc., 1949, 71, 3836.

43 - *HUCKER H. B., ZACCHEI A. G., COX S. V., BRODIE D. A. and CANTWELL N. H. R.*
Studies on the absorption, distribution, and excretion of indomethacin in various species.
J. Pharmacol. Exptl. Therap., 1966, 153, 237.

44 - *JAMES S. P. and JEFFERY D. J.*
Metabolism of derivatives of cyclohexane.
Abstr. 6th Int. Congr. Biochem., New-York, 1964, V, 81, 409.

45 - *JAMES S. P., JEFFERY D. J., WARING R. H. and WHITE D. A.*
Some metabolits of bromocyclopentane, bromocyclohexane and bromocycloheptane in the Rabbit.
Biochem. Pharmacol., 1970, 19, 743.

46 - *JAYLE M. F., BAULIEU E., CREPY O., POLONOVSKI J., et WEINNAM S. H.*
Analyse des stéroïdes hormonaux.
MASSON et Cie ed. PARIS, 1961, tome 1.

47 - *JONDORF W. R., PARKE D. V. and WILLIAMS R. T.*
The metabolism of (C14) hexachloroethane
Biochem. J., 1957, 65, 14 P.

48 - *KAY J. B., ROBINSON J. B., COX B., and POLKONJAK D.*
1,2-disubstituted cyclohexanes as substrates of acetylcholinesterase and muscarinic agents. A re.-investigation
J. Pharm. Pharmac., 1970, 22, 214.

49 - *KNIGHT R. H. and YOUNG L.*
The occurence of premercapturic acids.
Biochem. J., 1958, 70, 111.

50 - *LIPPMANN W.*
Antigastric acid secretories activities of N-N'-Bis (1-Naphtyl methyl)-1,4-Cyclohexane Bis (Methylamine) dihydrochloride, and structurally-related compounds in the Rat.
Arch. Int. Pharmacodyn., 1970, 188, 28.

51 - *MERRIT A. D. and TOMKINS G. M.*
Reversible oxydation of cyclic secondary alcohols by liver alcohol dehydrogenase.
J. Biol. Chem., 1959, 234, 2778.

52 - *MOLINIER J.*
Etude toxicologique et pharmacodynamique sur les cyclanones inférieures et leurs dérivés α chlorés.
Thèse Pharmacie (Université), Toulouse, 1963.

53 - *MOULAS F.*
Sur les méthodes statistiques d'estimation de la D.E. 50.
Thèse doct. ès Sciences Mathématiques appliquées, option statistique mathématique, Toulouse, 1964.

54 - *MULLEN J. O. and FOUTS J. R.*
Prolongation of hexobarbital sleeping time and inhibition of hepatic drug metabolism by adrenergic blocking agents in Mice.
Biochem. Pharmacol., 1965, 14, 305.

55 - *NATELSON S.*
Microtechniques in clinical chemistry.
THOMAS C. C. ed., New-York, 1961.

56 - *RANDERATH K.*
Chromatographie sur couches minces.
GAUTHIER VILLARS ed., Paris, 1964.

57 - *ROBELET A. et GUERRIN F.*
L'élimination biliaire des médicaments.
Act. Pharmacol., 1966, 19ème série, 91.

58 - *SCHLENK H. and LAMP B.*
The reduction of 1-3 dichloro-acetone with lithium aluminium hydride.
J. Amer. Chem. Soc., 1951, 73, 5493.

59 - *STAHL E., BOLLIGER H. R., BRENNER M., GANSHIRT H., MONGOLD H. K., SEILER H. and WALDI D.*
Thin layer chromatography. A Laboratory handbook.
Publ. s. direct. STAHL E. Academic Press, New-York, 1965.

60 - *VIOLA P. L.*
Le métabolisme du cyclohexane.
Proc. Int. Kongr. Arbeitsmed. Wien, Sept. 1966, 413.

61 - *VOLLMER K. O. und POISSON A.*
Zur Human pharmakokinetic des neuen, Stark-Analgeticums D L trans-2-dimethylaminophénylcyclohexen-3-trans-1-carbonsäureäethylesterhydrochlorid. Blutspiegel und Ausscheidung in Urine und Faeces nach einmaliger oraler Gabe der C^{14} markierten Substanz.
Arzneimittel Forsch. Dtsch. 1970, 20, 992.

62 - *WILLIAMS R. T.*
Detoxication mecanism.
CHAPMAN and HALL eds. London, 1959.

63 - *WILLIAMS R. T., MILLBURN P. and SMITH R. L.*
The influence of enterohepatic circulation on toxicity of drugs.
Ann. N. Y. Acad. Sc., 1965, 123, 110.

64 - *WYLIE D. W.*
Modified method for measuring potentation of barbiturate anesthesia and its relationship to hypothermia.
Proc. Soc. Exper. Biol., 1958, 98, 716.